

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045598**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- (45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.12.11**
- (21) Номер заявки  
**201892218**
- (22) Дата подачи заявки  
**2017.03.31**
- (51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 7/00** (2006.01)  
**A61P 27/02** (2006.01)  
**C07K 16/40** (2006.01)

---

(54) **СПОСОБЫ ИНГИБИРОВАНИЯ АНГИОГЕНЕЗА У ПАЦИЕНТА**

---

- (31) **62/315,857**
- (32) **2016.03.31**
- (33) **US**
- (43) **2019.03.29**
- (86) **PCT/US2017/025411**
- (87) **WO 2017/173290 2017.10.05**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ОМЕРОС КОРПОРЕЙШН (US);  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ЛЕСТЕР (GB)**
- (72) Изобретатель:  
**Демопулос Грегори А. (US), Швебле  
Ханс-Вильгельм (GB), Дадлер Томас,  
Хьелкер Ларри (US)**
- (74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**
- (56) **US-A1-20120315279  
US-A1-20130344073  
US-B2-8951522  
US-A1-20140134641  
US-A1-20150064176**

- 
- (57) В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам предотвращения, лечения, возвращения к прежнему состоянию и/или замедления ангиогенеза у пациента, который является млекопитающим, страдающего от или подверженного риску развития, зависимо от ангиогенеза заболевания или состояния, включающим введение пациенту количества ингибирующего MASP-2 средства, эффективного для ингибирования ангиогенеза. В некоторых вариантах осуществления этих аспектов изобретения ингибирующее MASP-2 средство представляет собой антитело против MASP-2 или его фрагмент.

**B1**

**045598**

**045598  
B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

По заявке на настоящий патент испрашивается приоритет временной патентной заявки № 62/315857, поданной 31 марта 2016 г., полное содержание которой, таким образом, приведено в качестве ссылки.

### Уровень техники

Система комплемента обеспечивает действующий на ранних этапах механизм инициации, усиления и координации иммунного ответа на инфекцию микроорганизмами и другие острые повреждения (M.K. Liszewski and J.P. Atkinson, 1993, in *Fundamental Immunology*, Third Edition, edited by W.E. Paul, Raven Press, Ltd., New York) у человека и других позвоночных. В то время как активация комплемента обеспечивает значительную защиту первой линии против потенциальных патогенов, виды активности комплемента, которые стимулируют защитный иммунный ответ, также могут представлять потенциальную угрозу для хозяина (K.R. Kalli, et al., *Springer Semin. Immunopathol.* 15:417 431, 19 94; B.P. Morgan, *Eur. J. Clinical Investig.* 24:219 228, 1994). Например, протеолитические продукты C3 и C5 привлекают и активируют нейтрофилы. В то время как они являются неотъемлемой частью защиты хозяина, активированные нейтрофилы являются неизбирательными в своем высвобождении деструктивных ферментов и могут вызывать повреждение органов. Кроме того, активация комплемента может вызывать накопление литических компонентов комплемента поблизости от клеток-хозяев, так же как на микроорганизмах-мишенях, приводя к лизису клетки-хозяина.

Система комплемента вовлечена также в патогенез многочисленных острых и хронических состояний заболевания, включая: инфаркт миокарда, инсульт, ARDS, реперфузионное повреждение, септический шок, синдром повышения проницаемости капилляров после термических ожогов, воспаление после операции в условиях искусственного кровообращения, отторжение трансплантата, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, миастению и болезнь Альцгеймера. Почти при всех этих состояниях, комплемент не является причиной, но является одним из нескольких факторов, вовлеченных в патогенез. Тем не менее, активация комплемента может являться главным патологическим механизмом и представляет собой эффективную точку для клинического контроля во многих из этих состояний заболевания. Растущее понимание важности опосредованного комплементом повреждения тканей во множестве состояний заболевания подчеркивает необходимость эффективных ингибирующих комплемент лекарственных средств. До настоящего времени, экулизумаб (Соларис®), антитело против компонента комплемента C5, является единственным нацеленным на комплемент лекарственным средством, одобренным для применения у человека. В то же время, C5 является одной из нескольких эффекторных молекул, локализованных "ниже" в каскаде активации комплемента, и блокирование C5 не ингибирует активацию системы комплемента. Таким образом, ингибитор начальных стадий активации комплемента может иметь значительные преимущества над "нижестоящим" ингибитором комплемента.

В настоящее время, является общепринятым, что систему комплемента можно активировать посредством трех отдельных путей: классического пути, лектинового пути и альтернативного пути. Классический путь обычно запускается посредством комплекса, состоящего из антител хозяина, связанных с чужеродной частицей (т.е. антигеном) и таким образом, требует предварительного воздействия антигена для получения специфического ответа антител. Поскольку активация классического пути зависит от предшествующего адаптивного иммунного ответа хозяина, классический путь является частью приобретенной иммунной системы. В отличие от этого, как лектиновый, так и альтернативный пути, являются независимыми от адаптивного иммунитета и являются частью врожденной иммунной системы.

Активация системы комплемента приводит к последовательной активации зимогенов - сериновых протеаз. Первой стадией в активации классического пути является связывание специфической узнающей молекулы, C1q, с антигеном, связанным с молекулами IgG и IgM. C1q является ассоциированным с проферментами сериновых протеаз C1r и C1s в форме комплекса, называемого C1. После связывания C1q с иммунным комплексом, за аутопротеолитическим расщеплением участка Arg-Ile C1r следует опосредованное C1r расщепление и активация C1s, который, таким образом, приобретает способность расщеплять C4 и C2. C4 расщепляется на два фрагмента, обозначенные C4a и C4b, и, сходным образом, C2 расщепляется на C2a и C2b. Фрагменты C4b являются способными формировать ковалентные связи с соседними гидроксильными группами или аминокетильными группами и образуют конвертазу C3 (C4b2a) посредством нековалентного взаимодействия с фрагментом C2a активированного C2. Конвертаза C3 (C4b2a) активирует C3 посредством протеолитического расщепления на субкомпоненты C3a и C3b, что приводит к образованию конвертазы C5 (C4b2a3b), которая, посредством расщепления C5, приводит к формированию мембраноатакующего комплекса (C5b в комбинации с полимерами C6, C7, C8 и C9, также обозначаемого как "MAC"), который может разрушать клеточные мембраны, приводя к лизису клеток. Активированные формы C3 и C4 (C3b и C4b) ковалентным образом накапливаются на поверхностях чужеродных мишеней, которые узнают рецепторы комплемента на множестве фагоцитов.

Первой стадией активации системы комплемента посредством лектинового пути является связывание молекул, узнающих специфический для лектинового пути паттерн, с их лигандами-мишенями. Этот процесс инициирует активацию специфических для лектинового пути проферментов сериновых протеаз, которые, в свою очередь, инициируют каскад реакций комплемента. Узнающие паттерн молекулы в лек-

тиновом пути содержат группу связывающих углеводы лектинов С-типа, т.е. связывающий маннан лектин (MBL), коллектин-11 (CL-11, также известный как CL-K1), коллектин-10 (CL-10, также известный как CL-L1), и три различных фиколина, т.е. Н-фиколин, М-фиколин и L-фиколин, которые связываются с ацетилированными структурами углеводов и белков посредством подобных фибриногену связывающих доменов (J. Lu et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1572:387-400, (2002); Holmskov et al., *Annu. Rev. Immunol.* 21:547-578 (2003); Teh et al., *Immunology* 101:225-232 (2000), J. Luet et al., *Biochim Biophys Acta* 1572:387-400 (2002); Hansen et al., *J. Immunol* 185(10):6096-6104 (2010), и Hendriksen et al., *J Immunol* 191(12):6117-27, 2013).

Ikeda et al. впервые показали что, подобно C1q, MBL может активировать систему комплемента при связывании с покрытыми маннаном дрожжей эритроцитами зависимым от C4 образом (Ikeda et al., *J. Biol. Chem.* 262:7451-7454, (1987)). MBL, член семейства белка коллектина, представляет собой кальций-зависимый лектин, который связывает углеводы с 3 и 4 гидроксигруппами, ориентированными в экваториальной плоскости пиранозного кольца. Выступающими лигандами для MBL, таким образом, являются D-манноза и N-ацетил-D-глюкозамин, в то время как углеводы, не удовлетворяющие этим стерическим требованиям, имеют не подающуюся детекции аффинность для MBL (Weis et al., *Nature* 360:127-134, (1992)). Взаимодействие между MBL и моновалентными сахарами является необычайно слабым, с константами диссоциации, как правило, в однозначном миллимолярном диапазоне. MBL достигает тесного, специфического связывания с гликановыми лигандами посредством avidности, т.е. посредством одновременного взаимодействия с многочисленными моносахаридными остатками, локализованными в тесной близости друг от друга (Lee et al., *Archiv. Biochem. Biophys.* 299:129-136, (1992)). MBL узнает углеводные паттерны, обычно покрывающие микроорганизмы, такие как бактерии, дрожжи, паразиты и определенные вирусы. В отличие от этого, MBL не узнает D-галактозу и сиаловую кислоту, предпоследний и последний сахара, обычно покрывающие "зрелые" комплексные гликоконъюгаты, присутствующие в гликопротеинах в плазме и на поверхности клеток млекопитающих. Считают, что эта специфичность связывания стимулирует узнавание "чужеродных" поверхностей и помогает защищать от "аутоактивации". Однако, MBL не связывается с высокой аффинностью с кластерами "предшественников" гликанов с высоким содержанием маннозы на N-связанных гликопротеинах и гликолипидах, секвестрированных в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи клеток млекопитающих (Maunard et al., *J. Biol. Chem.* 257:3788-3794, (1982)). Таким образом, поврежденные клетки являются потенциальными мишенями для активации лектинового пути посредством связывания MBL, и в более недавней работе показано, что CL-11 представляет собой другой субкомпонент узнавания лектинового пути, который инициирует активацию лектинового пути на подвергнутых стрессу или поврежденных клетках (Fagar et al., *J Clin Invest* 126:1911-1925, 2016).

Фиколины имеют тип лектинового домена, отличный от MBL, называемый подобным фибриногену доменом. Фиколины связывают остатки сахара независимым от  $Ca^{++}$  образом. У человека идентифицировано три вида фиколинов (L-фиколин, М-фиколин и Н-фиколин). Два фиколина сыворотки, L-фиколин и Н-фиколин, имеют общую специфичность для N-ацетил-D-глюкозамина; однако, Н-фиколин связывает также N-ацетил-D-галактозамин. Различие в специфичности для сахаров L-фиколина, Н-фиколина, CL-11 и MBL означает, что различные лектины могут являться комплементарными и нацеленными на различные, хотя и перекрывающиеся, гликоконъюгаты. Эту концепцию поддерживает недавнее сообщение о том, что из известных лектинов в лектиновом пути, только L-фиколин связывается специфически с липотейхоевой кислотой, гликококонъюгатом клеточной стенки, обнаруженном на всех грамположительных бактериях (Lynch et al., *J. Immunol.* 172:1198-1202, (2004)). Коллектины (т.е., MBL, CL-11, CL-10 и комплексы CL-11/CL-10) и фиколины не несут значительного сходства в аминокислотной последовательности. Однако, эти две группы белков имеют сходные доменные организации и, подобно C1q, собираются в олигомерные структуры, которые максимизируют возможность связывания во множестве участков.

Концентрации MBL в сыворотке являются высоко изменчивыми в здоровых популяциях, и это генетически контролируется посредством полиморфизмов/мутаций как в промоторной, так и в кодирующей областях гена MBL. В качестве белка острой фазы, экспрессия MBL дополнительно подвергается повышающей регуляции в ходе воспаления. L-фиколин присутствует в сыворотке в концентрациях, сходных с концентрациями MBL. Таким образом, ветвь L-фиколина из лектинового пути потенциально сравнима с ветвью MBL по физиологической важности. MBL и фиколины могут также функционировать как опсоины, которые позволяют фагоцитам нацеливаться на покрытые MBL и фиколином поверхности (см. Jack et al., *J Leukoc Biol.*, 77(3):328-36 (2004), Matsushita and Fujita, *Immunobiology*, 205 (4-5):490-7 (2002), Aoyagi et al., *J Immunol*, 174(1):418-25(2005). Эта опсонизация требует взаимодействия этих белков с рецепторами фагоцитов (Kuhlman et al., *J. Exp. Med.* 169:1133, (1989); Matsushita et al., *J. Biol. Chem.* 271:2448-54, (1996)), идентичность которых не была установлена.

MBL человека формирует специфическое и высокоаффинное взаимодействие посредством его подобного коллагену домена с уникальными подобными C1r/C1s сериновыми протеазами, названными ассоциированными с MBL сериновыми протеазами (MASP). До настоящего времени, описано три MASP. Сначала одиночный фермент "MASP" был идентифицирован и охарактеризован как фермент, ответст-

венный за инициацию каскада реакций комплемента (т.е., расщепление C2 и C4) (Matsushita et al., *J Exp Med* 176(6):1497-1502 (1992); Ji et al., *J. Immunol.* 150:571-578, (1993)). Впоследствии определили, что активность MASP фактически представляла собой смесь двух протеаз: MASP-1 и MASP-2 (Thiel et al., *Nature* 386:506-510, (1997)). Однако, показано, что комплекс MBL-MASP-2 сам по себе является достаточным для активации комплемента (Vorup Jensen et al., *J. Immunol.* 165:2093-2100, (2000)). Кроме того, только MASP-2 расщеплял C2 и C4 с высокой результативностью (Ambrus et al., *J. Immunol.* 170:1374-1382, (2003)). Таким образом, MASP-2 представляет собой протеазу, ответственную за активацию C4 и C2 для получения конвертазы C3, C4b2a. В этом заключается его значительное отличие от комплекса C1 классического пути, где скоординированная активность двух специфичных сериновых протеаз (Clr и Cls) приводит к активации системы комплемента. Кроме того, выделена третья новая протеаза, MASP-3 (Dahl, M.R., et al., *Immunity* 15:121-135, 2001). MASP-1 и MASP-3 представляют собой продукты одного и того же гена, полученные в результате альтернативного сплайсинга.

MASP разделяют идентичную доменную организацию с доменами Clr и Cls, ферментными компонентами комплекса C1 (Sim et al., *Biochem. Soc. Trans.* 28:545, (2000)). Эти домены включают N-концевой домен Clr/Clс/VEGF морского ежа/костного морфогенетического белка (CUB), подобный эпидермальному фактору роста домен, второй домен CUB, tandem доменов белков, контролирующих комплемент, и домен сериновой протеазы. Как и в протеазах C1, активация MASP-2 происходит посредством расщепления связи Arg-11e, примыкающей к домену сериновой протеазы, что приводит к расщеплению фермента на связанные дисульфидными связями цепи A и B, последняя из которых состоит из домена сериновой протеазы.

MBL может также связываться с полученной посредством альтернативного сплайсинга формой MASP-2, известной как ассоциированный с MBL белок 19 кДа (MAp19) или малый ассоциированный с MBL белок (sMAP), у которой отсутствует каталитическая активность MASP-2. (Stover, *J. Immunol.* 162:3481-3490, (1999); Takahashi et al., *Int. Immunol.* 11:859-863, (1999)). MAp19 содержит два первых домена MASP 2, за которыми следует дополнительная последовательность из четырех уникальных аминокислот. Функция MAp19 является неясной (Degn et al., *J Immunol. Methods*, 2011). Гены MASP-1 и MASP-2 локализованы на хромосомах 3 и 1 человека, соответственно (Schwaeble et al., *Immunobiology* 205:455-466, (2002)).

Ряд свидетельств позволяет предполагать, что существуют различные комплексы MBL-MASP и большая фракция MASP в сыворотке не входит в комплекс с MBL (Thiel, et al., *J. Immunol.* 165:878-887, (2000)). Как H-, так и L-фиколин, связываются со всеми MASP и активируют лектиновый путь комплемента, также, как MBL (Dahl et al., *Immunity* 15:127-135, (2001); Matsushita et al., *J. Immunol.* 158:3502-3506, (2002)). Как лектиновый, так и классический пути, формируют общую конвертазу C3 (C4b2a), и оба пути активации сходятся на этой стадии.

Повсеместно считают, что лектиновому пути комплемента принадлежит ведущая роль в защите хозяина против инфекции для наивного хозяина. Надежные доказательства вовлеченности MBL в защиту хозяина вытекают из анализов пациентов с уменьшенными уровнями функционального MBL в сыворотке (Kilpatrick, *Biochim. Biophys. Acta* 1572:401-413, (2002)). Для таких пациентов показана чувствительность к рецидивирующим бактериальным и грибковым инфекциям. Эти симптомы обычно проявляются в раннем возрасте, во время выраженного окна уязвимости, когда титр производных от материнских антител снижается, но до развития ответов полного репертуара антител. Этот синдром часто возникает в результате мутаций в нескольких участках в коллагеновой части MBL, которые мешают правильному формированию олигомеров MBL. Однако, поскольку MBL может функционировать в качестве независимого от комплемента опсонина, неизвестно, до какой степени увеличенная чувствительность к инфекции обусловлена нарушенной активацией комплемента.

В отличие от классического и лектинового путей, не было выявлено инициаторов альтернативного пути для осуществления функций узнавания, выполняемых C1q и лектинами в двух других путях. В настоящее время считается общепринятым, что альтернативный путь спонтанно подвергается низкому уровню переменной активации, которая легко может усиливаться на чужеродных или других аномальных поверхностях (бактерий, дрожжей, инфицированных вирусами клеток или поврежденных тканей), лишенных надлежащих молекулярных элементов, удерживающих спонтанную активацию комплемента под контролем. Существует четыре белка плазмы, напрямую вовлеченных в активацию альтернативного пути: C3, факторы B и D, и пропердин.

Несмотря на обширные доказательства участия как классического, так и альтернативного путей комплемента в патогенезе неинфекционных заболеваний человека, роль лектинового пути только начинают оценивать. Недавние исследования обеспечивают доказательство того, что активация лектинового пути может являться ответственной за активацию комплемента и связанное воспаление при ишемическом/реперфузионном повреждении. Collard et al. (2000) опубликовали, что культивируемые эндотелиальные клетки, подвергнутые окислительному стрессу, связываются с MBL и демонстрируют накопление C3 под воздействием человеческой сыворотки (Collard et al., *Am. J. Pathol.* 156:1549-1556, (2000)). Кроме того, обработка человеческой сыворотки блокирующими моноклональными антителами против MBL ингибировала связывание MBL и активацию комплемента. Эти обнаружения распространялись на

модель миокардиальной ишемии-реперфузии на крысах, в которой у крыс, подвергнутых обработке блокирующим антителом, нацеленным против крысиного MBL, показано значительно меньшее повреждение миокарда после окклюзии коронарной артерии, чем у крыс, подвергнутых обработке контрольным антителом (Jordan et al., *Circulation* 104:1413-1418, (2001)). Молекулярный механизм связывания MBL с эндотелием сосудов после окислительного стресса остается неясным; недавнее исследование позволяет предполагать, что активация лектинового пути после окислительного стресса может быть опосредована связыванием MBL с цитокератинами эндотелия сосудов, а не с гликоконъюгатами (Collard et al., *Am. J. Pathol.* 159:1045-1054, (2001)). В других исследованиях выявлено вовлечение классического и альтернативного путей в патогенез ишемического/реперфузионного повреждения, и роль лектинового пути в этом заболевании остается спорной (Riedermann, N.C., et al., *Am. J. Pathol.* 162:363-367, 2003).

В недавнем исследовании показано, что MASP-1 (и возможно, также MASP-3) является необходимым для превращения фермента активации альтернативного пути фактора D из его зимогенной формы в его ферментативно активную форму (см. Takahashi M. et al., *J. Exp. Med.* 207(1):29-37 (2010)). Физиологическая важность этого процесса подчеркнута отсутствием функциональной активности альтернативного пути в плазме мышей с недостаточностью MASP-1/3. Протеолитическое получение C3b из нативного C3 необходимо для функционирования альтернативного пути. Поскольку конвертаза C3 (C3bBb) альтернативного пути содержит C3b в качестве необходимой субъединицы, вопрос относительно происхождения первой C3b посредством альтернативного пути представляет собой озадачивающую проблему и побуждает к серьезным исследованиям.

C3 принадлежит к семейству белков (вместе с C4 и  $\alpha$ 2-макроглобулином), которое имеет редкую посттрансляционную модификацию, известную как тиоэфирная связь. Тиоэфирная группа состоит из глутамина, в котором концевая карбонильная группа формирует тиоэфирную связь с сульфгидрильной группой цистеина, который находится через три аминокислоты. Эта связь является нестабильной, и электрофильный глутамил-тиоэфир может вступать в реакцию с нуклеофильными группами, такими как гидроксильная группа или аминогруппа, и таким образом формирует ковалентную связь с другими молекулами. Тиоэфирная группа является достаточно стабильной при секвестрировании в гидрофобном кармане интактного C3. Однако протеолитическое расщепление C3 до C3a и C3b приводит к экспонированию высоко реакционноспособной тиоэфирной связи на C3b и, после нуклеофильной атаки соседних групп, содержащих гидроксильные группы или аминогруппы, C3b становится ковалентно присоединенным к мишени. В дополнение к его хорошо задокументированной роли в ковалентном присоединении C3b к мишеням комплемента, считают, что тиоэфир C3 также играет главную роль в запуске альтернативного пути. Согласно общепринятой "теории холостой активации", альтернативный путь инициируется образованием растворимой конвертазы, iC3Bb, которая формируется из C3 с гидролизованым тиоэфиром (iC3; C3(H<sub>2</sub>O)) и фактора В (Lachmann, P.J., et al., *Springer Semin. Immunopathol.* 7:143-162, (1984)). Подобный C3b C3(H<sub>2</sub>O) образуется из нативного C3 посредством медленного спонтанного гидролиза внутреннего тиоэфира в белке (Pangburn, M.K., et al., *J. Exp. Med.* 154:856-867, 1981). За счет активности конвертазы C3(H<sub>2</sub>O)Bb, молекулы C3b накапливаются на поверхности мишени, таким образом, инициируя альтернативный путь.

Очень мало известно об инициаторах активации альтернативного пути. Считают, что активаторы включают клеточные стенки дрожжей (зимозан), множество чистых полисахаридов, эритроциты кролика, определенные иммуноглобулины, вирусы, грибы, бактерии, клетки опухолей животных, паразитов и поврежденные клетки. Единственным общим признаком этих активаторов является присутствие углевода, но сложность и разнообразие углеводных структур затрудняют установление общих молекулярных детерминант, которые распознаются. Является общепринятым, что активация альтернативного пути контролируется посредством точного равновесия между ингибирующими регуляторными компонентами этого пути, такими как фактор H, фактор I, DAF и CR1, и пропердин, который является единственным положительным регулятором альтернативного пути (см. Schwaebler W.J. and Reid K.B., *Immunol Today* 20(1):17-21 (1999)).

В дополнение к кажущемуся нерегулируемым механизму активации, описанному выше, альтернативный путь может также предоставлять мощную усиливающую петлю для конвертазы C3 (C4b2a) лектинового/классического пути, поскольку любой образованный C3b может вместе с фактором В участвовать в формировании дополнительной конвертазы альтернативного пути C3 (C3bBb). Конвертаза альтернативного пути C3 стабилизируется посредством связывания с пропердином. Пропердин увеличивает время полужизни конвертазы альтернативного пути C3 в шесть - десять раз. Добавление C3b к конвертазе C3 альтернативного пути приводит к формированию конвертазы C5 альтернативного пути.

Считали, что все три пути (т.е., классический, лектиновый и альтернативный) сходятся на C5, которая расщепляется с формированием продуктов с множественными провоспалительными эффектами. Объединенный путь обозначен как терминальный путь активации комплемента. C5a является наиболее сильным анафилатоксином, индуцирующим изменения в гладкой мускулатуре и сосудистом тоне, также как в проницаемости сосудов. Он является также сильным хемотаксином и активатором как нейтрофилов, так и моноцитов. Опосредованная C5a клеточная активация может значительно усиливать воспалительные ответы посредством индукции высвобождения множества дополнительных медиаторов

воспаления, включая цитокины, гидролитические ферменты, метаболиты арахидоновой кислоты и реакционноспособные формы кислорода. Расщепление C5 приводит к формированию C5b-9, также известного как мембраноатакующий комплекс (МАС). В настоящее время существуют веские доказательства того, что сублитическое накопление МАС может играть важную роль в воспалении в дополнение к его роли в качестве литического порообразующего комплекса.

В дополнение к ее важной роли в иммунной защите, система комплемента вносит вклад в повреждение тканей при множестве клинических состояний. Таким образом, существует настоятельная необходимость разработки терапевтически эффективных ингибиторов комплемента для предотвращения этих неблагоприятных эффектов.

Хорошо установлено, что ангиогенез вовлечен в патогенез множества нарушений, включая солидные опухоли и метастазирование, и неоваскулярные офтальмологические заболевания, такие как связанная с возрастом дегенерация желтого пятна (AMD), пролиферативная диабетическая ретинопатия и неоваскулярная глаукома.

С учетом роли ангиогенеза во множестве заболеваний и нарушений, существует также настоятельная необходимость разработки терапевтически эффективных ингибиторов ангиогенеза.

### **Сущность изобретения**

Это краткое изложение сущности изобретения приведено для представления в упрощенной форме набора концепций, которые дополнительно описаны ниже в подробном описании. Это краткое изложение сущности изобретения как не предназначено для идентификации ключевых признаков заявленного объекта изобретения, так и не предназначено для использования в качестве вспомогательного средства для определения объема заявленного объекта изобретения.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам предотвращения, лечения, возвращения к прежнему состоянию и/или задержки ангиогенеза у пациента, который является млекопитающим, страдающим или подверженным риску развития, зависящего от ангиогенеза заболевания или состояния, включающим введение пациенту количества ингибирующего MASP-2 средства, эффективного для ингибирования ангиогенеза. В некоторых вариантах осуществления этих аспектов изобретения, ингибирующее MASP-2 средство представляет собой антитело против MASP-2 или его фрагмент. В следующих вариантах осуществления, антитело против MASP-2 имеет уменьшенную эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления, ингибирующее MASP-2 средство представляет собой ингибирующий MASP-2 пептид или непептидный ингибитор MASP-2.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композициям для ингибирования неблагоприятных эффектов ангиогенеза, содержащим терапевтически эффективное количество ингибирующего MASP-2 средства и фармацевтически приемлемый носитель. Изобретение относится также к способам изготовления лекарственного средства для использования для ингибирования неблагоприятных эффектов ангиогенеза у живых нуждающихся в этом пациентов, содержащего терапевтически эффективное количество ингибирующего MASP-2 средства в фармацевтическом носителе. Изобретение относится также к способам изготовления лекарственных средств для использования для ингибирования ангиогенеза для лечения каждого из состояний, заболеваний и нарушений, описанных в настоящем описании ниже.

Способы, композиции и лекарственные средства по изобретению можно использовать для ингибирования неблагоприятных эффектов ангиогенеза *in vivo* у пациента, который является млекопитающим, включая людей, страдающих от острого или хронического патологического состояния или повреждения, как описано далее в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к способам ингибирования ангиогенеза у пациента, который является млекопитающим, страдающим зависимым от ангиогенеза заболеванием или состоянием, включающим введение индивиду композиции, содержащей количество ингибирующего MASP-2 средства, эффективное для ингибирования ангиогенеза. В некоторых вариантах осуществления, зависящее от ангиогенеза заболевание или состояние представляет собой зависящую от ангиогенеза злокачественную опухоль, например, такую как зависящая от ангиогенеза злокачественная опухоль, выбранная из группы, состоящей из солидной опухоли(опухолей), передающихся через кровь опухолей, карциноидных опухолей высокого риска и метастазов опухолей. В некоторых вариантах осуществления, зависящее от ангиогенеза заболевание или состояние представляет собой зависящую от ангиогенеза доброкачественную опухоль, например, такую как зависящая от ангиогенеза доброкачественная опухоль, выбранная из группы, состоящей из гемангиом, невринома слухового нерва, нейрофибром, трахом, карциноидных опухолей и пиогенных гранулем. В некоторых вариантах осуществления, зависящее от ангиогенеза заболевание или состояние представляет собой офтальмологическое ангиогенное заболевание или состояние, например, такое как офтальмологическое ангиогенное заболевание или состояние, выбранное из группы, состоящей из связанной с возрастом дегенерации желтого пятна (AMD), увеита, меланомы глаза, неоваскуляризации роговицы, первичного птеригия, стромального кератита HSV, индуцированного HSV-1 лимфангиогенеза роговицы, пролиферативной диабетической ретинопатии, ретинопатии недоношенных, окклюзии вен сетчатки, отторжения трансплантата роговицы, неоваскулярной глаукомы и покраснения радужки.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения индивида, страдающего

офтальмологическим ангиогенным заболеванием или состоянием, выбранным из группы, состоящей из AMD, увеита, меланомы глаз, неоваскуляризации роговицы, первичного птеригия, стромального кератита HSV, индуцированного HSV-1 лимфангиогенеза роговицы, пролиферативной диабетической ретинопатии, диабетического отека желтого пятна, ретинопатии недоношенных, окклюзии вен сетчатки, отторжения трансплантата роговицы, неоваскулярной глаукомы, геморрагии стекловидного тела, вторичной по отношению к пролиферативной диабетической ретинопатии, нейромиелита зрительного нерва и покраснения радужки, включающим введение индивиду количества ингибирующего MASP-2 средства, эффективного для ингибирования ангиогенеза.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам ингибирования ангиогенеза опухолей, включающим введение индивиду со злокачественной опухолью количества ингибирующего MASP-2 средства, эффективного для ингибирования ангиогенеза.

#### Описание чертежей

Вышеупомянутые аспекты и множество сопутствующих преимуществ этого изобретения смогут быть быстрее оценены и станут более доступными для понимания путем ссылки на нижеследующее подробное описание, рассмотренное в сочетании с прилагаемыми чертежами, где:

фиг. 1 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую геномную структуру MASP-2 человека;

фиг. 2A представляет собой схематическую диаграмму, иллюстрирующую доменную структуру белка MASP-2 человека;

фиг. 2B представляет собой схематическую диаграмму, иллюстрирующую доменную структуру белка MAr19 человека;

фиг. 3 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую стратегию нокаута мышинового гена MASP-2;

фиг. 4 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую конструкцию минигена MASP-2 человека;

на фиг. 5A представлены результаты, показывающие, что недостаточность MASP-2 приводит к потере опосредованной лектиновым путем активации C4, как измерено по отсутствию накопления C4b на маннани, как описано в примере 2;

на фиг. 5B представлены результаты, показывающие, что недостаточность MASP-2 приводит к потере опосредованной лектиновым путем активации C4, как измерено по отсутствию накопления C4b на зимозане, как описано в примере 2;

на фиг. 5C представлены результаты, показывающие относительные уровни активации C4 в образцах сыворотки, полученных из линий MASP-2+/-; MASP-2-/- и линий дикого типа, как измерено по накоплению C4b на маннани и на зимозане, как описано в примере 2;

на фиг. 6 представлены результаты, показывающие, что добавление мышинового рекомбинантного MASP-2 к образцам сыворотки MASP-2-/- восстанавливает опосредованную лектиновым путем активацию C4 зависимым от концентрации белка образом, как измерено по накоплению C4b на маннани, как описано в примере 2;

на фиг. 7 представлены результаты, показывающие, что классический путь является функциональным в линии MASP-2-/-, как описано в примере 8;

на фиг. 8A представлены результаты, показывающие, что антитело против MASP-2 Fab2 #11 ингибирует формирование конвертазы C3, как описано в примере 10;

на фиг. 8B представлены результаты, показывающие, что антитело против MASP-2 Fab2 #11 связывается с нативным MASP-2 крысы, как описано в примере 10;

на фиг. 8C представлены результаты, показывающие, что антитело против MASP-2 Fab2 #41 ингибирует расщепление C4, как описано в примере 10;

на фиг. 9 представлены результаты, показывающие, что обнаружено, что все протестированные антитела против MASP-2 Fab2, которые ингибируют формирование конвертазы C3, ингибируют также расщепление C4, как описано в примере 10;

фиг. 10 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую использование рекомбинантных полипептидов, полученных из крысиного MASP-2, для картирования эпитопов блокирующих антител против MASP-2 Fab2, как описано в примере 11;

на фиг. 11 представлены результаты, показывающие связывание антител против MASP-2 Fab2 #40 и #60 с полипептидами крысиного MASP-2, как описано в примере 11;

на фиг. 12A представлены результаты, показывающие исходные уровни белка VEGF в RPE-хориоидальном комплексе, выделенном из мышей дикого типа (+/+) и мышей MASP-2(-/-), как описано в примере 12;

на фиг. 12B представлены результаты, показывающие уровни белка VEGF в RPE-хориоидальном комплексе у мышей дикого типа (+/+) и у мышей MASP-2(-/-) на сутки 3 после индуцированного лазером повреждения в модели дегенерации желтого пятна, как описано в примере 12;

на фиг. 13 представлены результаты, показывающие средний объем хориоидальной неоваскуляризации (CNV) на сутки семь после индуцированного лазером повреждения у мышей дикого типа (+/+) и у мышей MASP-2(-/-), как описано в примере 12;

на фиг. 14 графически проиллюстрирован уровень накопления C4b, измеренный как % от контроля,

в образцах, отобранных в различные временные точки после подкожного (SC) дозирования либо 0,3 мг/кг, либо 1,0 мг/кг мышинового моноклонального антитела против MASP-2 у мышей WT, как описано в примере 13;

на фиг. 15 графически проиллюстрирован уровень накопления C4b, измеренный как % от контроля, в образцах, отобранных в различные временные точки после внутрибрюшинного (IP) дозирования 0,6 мг/кг мышинового моноклонального антитела против MASP-2 у мышей WT, как описано в примере 13;

на фиг. 16 графически проиллюстрирован средний объем хориоидальной неоваскуляризации (CNV) на сутки семь после индуцированного лазером повреждения у мышей WT (+/+), подвергнутых предварительной однократной IP инъекции 0,3 мг/кг или 1,0 мг/кг мышинового моноклонального антитела против MASP-2; как описано в примере 14;

на фиг. 17A графически проиллюстрирован уровень накопления MAC в присутствии или в отсутствие моноклонального антитела против MASP-2 человека (OMS646) в условиях анализа, специфических для лектинового пути, показывающий, что OMS646 ингибирует опосредованное лектином накопление MAC с значением IC<sub>50</sub> приблизительно 1 нМ, как описано в примере 15;

на фиг. 17B графически проиллюстрирован уровень накопления MAC в присутствии или в отсутствие моноклонального антитела против MASP-2 человека (OMS646) в условиях анализа, специфических для классического пути, показывающий, что OMS646 не ингибирует опосредованное классическим путем накопление MAC, как описано в примере 15;

на фиг. 17C графически проиллюстрирован уровень накопления MAC в присутствии или в отсутствие моноклонального антитела против MASP-2 человека (OMS646) в условиях анализа, специфических для альтернативного пути, показывающий, что OMS646 не ингибирует опосредованное альтернативным путем накопление MAC, как описано в примере 15;

на фиг. 18 графически проиллюстрирован фармакокинетический (PK) профиль моноклонального антитела против MASP-2 человека (OMS646) у мышей, показывающий концентрацию OMS646 (среднее из n=3 животных/группы) как функцию от времени после введения в указанной дозе, как описано в примере 15;

на фиг. 19A графически проиллюстрирован фармакодинамический (PD) ответ моноклонального антитела против MASP-2 человека (OMS646), измеренный как падение системной активности лектинового пути, у мышей после внутривенного введения, как описано в примере 15;

на фиг. 19B графически проиллюстрирован фармакодинамический (PD) ответ моноклонального антитела против MASP-2 человека (OMS646), измеренный как падение системной активности лектинового пути, у мышей после подкожного введения, как описано в примере 15; и

на фиг. 20 графически проиллюстрирована площадь хориоидальной неоваскуляризации (CNV) как процент от площади индуцированных лазером очагов на сутки семь после повреждения у мышей WT (+/+), подвергнутых предварительной обработке с использованием 2 мг/кг, 5 мг/кг или 20 мг/кг моноклонального антитела против MASP-2 человека (OMS646), введенного SC, или антитела против VEGF, введенного IP, как описано в примере 16.

#### Описание списка последовательностей

- SEQ ID NO: 1 κДНК MAp19 человека
- SEQ ID NO: 2 человеческий белок MAp19 (с лидерной последовательностью)
- SEQ ID NO: 3 человеческий белок MAp19 (зрелый)
- SEQ ID NO: 4 κДНК MASP-2 человека
- SEQ ID NO: 5 человеческий белок MASP-2 (с лидерной последовательностью)
- SEQ ID NO: 6 человеческий белок MASP-2 белок (зрелый)
- SEQ ID NO: 7 гДНК MASP-2 человека (экзоны 1-6)
- Антигены: (по отношению к зрелому белку MASP-2)
- SEQ ID NO: 8 последовательность CUBI (ак 1-121)
- SEQ ID NO: 9 последовательность CUBEGF (ак 1-166)
- SEQ ID NO: 10 CUBEGFCUBII (ак 1-293)
- SEQ ID NO: 11 область EGF (ак 122-166)
- SEQ ID NO: 12 домен сериновой протеазы (ак 429-671)
- SEQ ID NO: 13 неактивный домен сериновой протеазы (ак 610-625 с мутацией Ser618 до Ala)
- SEQ ID NO: 14 TPLGPKWPEPVFGRL (пептид CUBI)
- SEQ ID NO: 15 TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQ (пептид CUBI)
- SEQ ID NO: 16 TFRSDYSN (кор связывающей MBL области)
- SEQ ID NO: 17 FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (связывающая MBL область)
- SEQ ID NO: 18 IDECQVAPG (пептид EGF)
- SEQ ID NO: 19 ANMLCAGLESGGKDCRGDSGGALV (кор связывающей сериновую протеазу области)

Подробное описание

Пептидные ингибиторы:

SEQ ID NO: 20 полноразмерная κДНК MBL



SEQ ID NO: 21 полноразмерный белок MBL  
 SEQ ID NO: 22 OGK-X-GP (консенсус связывания)  
 SEQ ID NO: 23 OGKLG  
 SEQ ID NO: 24 GLR GLQ GPO GKL GPO G  
 SEQ ID NO: 25 GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GPO GPO  
 SEQ ID NO: 26 GKDGRDGTKGEKGEPPGQGLRGLQGPOGKLGPOG  
 SEQ ID NO: 27 GAOGSOGEKGAOGPPGPOGPOGKMGPKGEOGDO (h-фиколин человека)  
 SEQ ID NO: 28 GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPOGKAGPOGPNGAOGEO (фиколин р35 человека)  
 SEQ ID NO: 29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI (участок расщепления C4)  
 Ингибиторы экспрессии:  
 SEQ ID NO: 30 кДНК домена CUBI-EGF (нуклеотиды 22-680 из SEQ ID NO: 4)  
 SEQ ID NO: 31  
 5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC 3'  
 Нуклеотиды 12-45 из SEQ ID NO: 4, включая участок старта трансляции MASP-2 (смысловые)  
 SEQ ID NO: 32  
 5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3'  
 Нуклеотиды 361-396 из SEQ ID NO: 4, кодирующие область, содержащую участок связывания MBL MASP-2 (смысловые)  
 SEQ ID NO: 33  
 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAA3'  
 Нуклеотиды 610-642 из SEQ ID NO: 4, кодирующие область, содержащую домен CUBII  
 Праймеры для клонирования:  
 SEQ ID NO: 34 CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC (5' ПЦР для CUB)  
 SEQ ID NO: 35 GGAATTCCTAGGCTGCATA (3' ПЦР ДЛЯ CUB)  
 SEQ ID NO: 36 GGAATTCCTACAGGGCGCT (3' ПЦР ДЛЯ CUBIEGF)  
 SEQ ID NO: 37 GGAATTCCTAGTAGTGGAT (3' ПЦР ДЛЯ CUBIEGFCUBII)  
 SEQ ID NO: 38-47 представляют собой праймеры для клонирования для гуманизованного антитела  
 SEQ ID NO: 48 представляет собой пептидную связь из 9 ак  
 Экспрессирующий вектор:  
 SEQ ID NO: 49 представляет собой вставку минигена MASP-2  
 SEQ ID NO: 50 представляет собой кДНК MASP-2 мыши  
 SEQ ID NO: 51 представляет собой мышинный белок MASP-2 (с лидерной последовательностью)  
 SEQ ID NO: 52 представляет собой зрелый мышинный белок MASP-2 белок  
 SEQ ID NO: 53 представляет собой кДНК MASP-2 крысы  
 SEQ ID NO: 54 представляет собой крысиный белок MASP-2 (с лидерной последовательностью)  
 SEQ ID NO: 55 представляет собой зрелый крысиный белок MASP-2  
 SEQ ID NO: 56-59 представляют собой олигонуклеотиды для сайт-направленного мутагенеза человеческого MASP-2, используемые для получения человеческого MASP-2A  
 SEQ ID NO: 60-63 представляют собой олигонуклеотиды для сайт-направленного мутагенеза мышинного MASP-2, используемые для получения мышинного MASP-2A  
 SEQ ID NO: 64-65 представляют собой олигонуклеотиды для сайт-направленного мутагенеза крысиного MASP-2, используемые для получения крысиного MASP-2A  
 SEQ ID NO: 66 ДНК, кодирующая переменную область тяжелой цепи (VH) 17D20\_dc35VH21N11VL (OMS646) (без сигнального пептида)  
 SEQ ID NO: 67 полипептид переменной области тяжелой цепи (VH) 17D20\_dc35VH21N11VL (OMS646)  
 SEQ ID NO: 68 полипептид переменной области тяжелой цепи (VH) 17N16mc  
 SEQ ID NO: 69 полипептид переменной области легкой цепи (VL) 17D20\_dc21N11VL (OMS644)  
 SEQ ID NO: 70 ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи (VL) 17N16\_dc17N9 (OMS641) (без сигнального пептида)  
 SEQ ID NO: 71 полипептид переменной области легкой цепи (VL) 17N16\_dc17N9 (OMS641)

#### Подробное описание

Настоящее изобретение основано на неожиданном обнаружении авторами настоящего изобретения того, что является возможным ингибирование опосредованного лектином пути MASP-2, в то же время оставляя классический путь интактным. Настоящее изобретение относится также к использованию MASP-2 в качестве терапевтической мишени для ингибирования клеточных повреждений, связанных с активацией опосредованного лектином пути комплемента, в то же время оставляя классический (зависимый от C1q) путь компонента иммунной системы интактным.

#### I. Определения.

Если конкретно не определено иное, все термины, применяемые в настоящем описании, имеют то

же самое значение, которое понятно специалисту в области настоящего изобретения. Следующие определения представлены с целью внесения ясности в отношении терминов, как их используют в описании и формуле изобретения для описания настоящего изобретения.

В рамках изобретения, термин "зависимая от MASP-2 активация комплемента" относится к зависимой от MASP-2 активации лектинового пути, которая происходит в физиологических условиях (т.е., в присутствии  $Ca^{++}$ ), приводящих к формированию конвертазы C3 лектинового пути C4b2a и после накопления продукта расщепления C3 C3b, последовательно до конвертазы C5 C4b2a(C3b)n, которую определили в качестве первичной причины опсонизации.

В рамках изобретения, термин "альтернативный путь" относится к активации комплемента, которая запускается, например, посредством зимозана из клеточных стенок грибов и дрожжей, липополисахарида (LPS) из наружной мембраны грамотрицательных бактерий, и эритроцитов кролика, так же как из множества чистых полисахаридов, эритроцитов кролика, вирусов, бактерий, клеток опухолей животных, паразитов и поврежденных клеток, и которую традиционно считают возникающей из-за спонтанного протеолитического образования C3b из фактора комплемента C3.

В рамках изобретения, термин "лектиновый путь" относится к активации комплемента, которая происходит посредством специфического связывания сывороточных и несывороточных связывающих углеводы белков, включая связывающий маннан лектин (MBL), CL-11 и фиколины (H-фиколин, M-фиколин или L-фиколин).

В рамках изобретения, термин "классический путь" относится к активации комплемента, запускаемой посредством антитела, связанного с чужеродной частицей и требующей связывания узнающей молекулы C1q.

В рамках изобретения, термин "ингибирующее MASP-2 средство" относится к любому средству, которое связывается или непосредственно взаимодействует с MASP-2 и эффективно ингибирует зависимую от MASP-2 активацию комплемента, включая антитела против MASP-2 и их связывающие MASP-2 фрагменты, природные и синтетические пептиды, малые молекулы, растворимые рецепторы MASP-2, ингибиторы экспрессии и выделенные натуральные ингибиторы, и относится также к пептидам, которые конкурируют с MASP-2 за связывание с другой узнающей молекулой (например, MBL, H-фиколином, M-фиколином или L-фиколином) в лектиновом пути, но не относится к антителам, связывающим другие узнающие молекулы. Ингибирующие MASP-2 средства, которые можно использовать в способе по изобретению могут уменьшать зависимую от MASP-2 активацию комплемента более чем на 20%, например, более чем на 50%, например, более чем на 90%. В одном варианте осуществления, ингибирующее MASP-2 средство уменьшает зависимую от MASP-2 активацию комплемента более чем на 90% (т.е., в результате активация комплемента MASP-2 составляет только 10% или менее).

В рамках изобретения, термин "ангиогенез" относится к росту новых микрососудов из предсуществующих кровеносных сосудов.

В рамках изобретения, термин "неоангиогенез" относится к ангиогенезу, когда он вовлечен в заболевание или состояние, которое не является физиологическим или является патологическим.

В рамках изобретения, термин "антитело" относится к антителам и их фрагментам антител, происходящим из любого продуцирующего антитело млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика и примата, включая человека), или из гибридомы, отбора фагов, рекомбинантной экспрессии или трансгенных животных (или других способов получения антител или фрагментов антител), которые специфически связываются с полипептидом-мишенью, например, такой как MASP-2, его полипептиды или части. Не предусмотрено, что термин "антитело" ограничен применительно к источнику антитела или способу, которым оно получено (например, посредством гибридомы, отбора фагов, рекомбинантной экспрессии, трансгенного животного, синтеза пептидов и т.д.). Иллюстративные антитела включают поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела; панспецифические, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, триспецифические антитела); гуманизированные антитела; мышинные антитела; химерные, мышино-человеческие, примато-мышинные, примато-человеческие моноклональные антитела; и антиидиотипические антитела, и могут представлять собой любое интактное антитело или его фрагмент. В рамках изобретения, термин "антитело" включает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как dAb, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), одноцепочечные антитела (ScFv), их синтетические варианты, природные варианты, слитые белки, содержащие часть антитела с антигенсвязывающим фрагментом требуемой специфичности, гуманизированные антитела, химерные антитела, и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий участок или фрагмент (узнающий эпитоп участок) требуемой специфичности.

"Моноклональное антитело" относится к гомогенной популяции антител, где моноклональное антитело состоит из аминокислот (природных и неприродных), вовлеченных в избирательное связывание эпитопа. Моноклональные антитела являются высоко специфическими для антигена-мишени. Термин "моноклональное антитело" включает не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), одноцепочечные антитела (ScFv), их варианты, слитые белки, содержащие антигенсвязывающую часть, гуманизированные

моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела, и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий фрагмент (узнающий эпитоп участок) требуемой специфичности и способна связываться с эпитопом. Он не является ограничивающим применительно к источнику антитела или способу, которым оно получено (например, посредством гибридомы, отбора фагов, рекомбинантной экспрессии, трансгенных животных и т.д.). Термин включает полноразмерные иммуноглобулины, так же как фрагменты и т.д., описанное выше под определением "антитело".

В рамках изобретения, термин "фрагмент антитела" относится к части, происходящей из полноразмерного антитела или относящейся к полноразмерному антителу, например, такому как антитело против MASP-2, как правило, включающей его антигенсвязывающую или переменную область. Иллюстративные примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub> и Fv, фрагменты scFv, диатела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифические антитела, сформированные из фрагментов антител.

В рамках изобретения, "одноцепочечный Fv" или "scFv" фрагмент антитела содержит домены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> антитела, где эти домены присутствуют на одной полипептидной цепи. Как правило, полипептид Fv далее включает в себя полипептидный линкер между доменами V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, который позволяет scFv формировать желательную структуру для связывания антигена.

В рамках изобретения, "химерное антитело" представляет собой рекомбинантный белок, содержащий переменные домены и определяющие комплементарность области, происходящие из антитела из не относящихся к человеку видов (например, грызунов), в то время как остальная часть молекулы антитела происходит из антитела человека.

В рамках изобретения, "гуманизованное антитело" представляет собой химерное антитело, содержащее минимальную последовательность, соответствующую специфическим определяющим комплементарность областям, происходящим из не относящегося к человеку иммуноглобулина, трансплантированным в каркас человеческого антитела. Гуманизованные антитела, как правило, представляют собой рекомбинантные белки, в которых только определяющие комплементарность области антитела происходят из не относящегося к человеку источника.

В рамках изобретения, термин "связывающий маннан лектин" ("MBL") является эквивалентным связывающему маннан белку ("MBP").

В рамках изобретения, "мембраноатакующий комплекс" ("MAC") относится к комплексу из пяти терминальных компонентов комплемента (C5b в комбинации с C6, C7, C8 и C-9), который внедряется внутрь мембраны и разрушает ее (также обозначенному как C5b-9).

В рамках изобретения, "индивид" включает всех млекопитающих, включая, без ограничения, человека, нечеловекообразных приматов, собак, кошек, лошадей, овец, коз, коров, кроликов, свиней и грызунов.

В рамках изобретения, аминокислотные остатки имеют следующие сокращенные обозначения: аланин (Ala; A), аспарагин (Asn; N), аспарагиновая кислота (Asp; D), аргинин (Arg; R), цистеин (Cys; C), глутаминовая кислота (Glu; E), глутамин (Gln; Q), глицин (Gly; G), гистидин (His; H), изолейцин (Ile; I), лейцин (Leu; L), лизин (Lys; K), метионин (Met; M), фенилаланин (Phe; F), пролин (Pro; P), серин (Ser; S), треонин (Thr; T), триптофан (Trp; W), тирозин (Tyr; Y) и валин (Val; V).

В самом широком смысле, природные аминокислоты можно разделять на группы на основании химических характеристик боковых цепей соответствующих аминокислот. Под "гидрофобной" аминокислотой понимают Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys или Pro. Под "гидрофильной" аминокислотой понимают Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg или His. Эту группировку аминокислот далее можно разделить на подклассы следующим образом. Под "незаряженной гидрофильной" аминокислотой понимают Ser, Thr, Asn или Gln. Под "кислой" аминокислотой понимают Glu или Asp. Под "основной" аминокислотой понимают Lys, Arg или His.

В рамках изобретения, термин "консервативная аминокислотная замена" проиллюстрирован заменой среди аминокислот внутри каждой из следующих групп: (1) глицин, аланин, валин, лейцин, и изолейцин, (2) фенилаланин, тирозин, и триптофан, (3) серин и треонин, (4) аспарат и глутамат, (5) глутамин и аспарагин, и (6) лизин, аргинин и гистидин.

Термин "олигонуклеотид", в рамках изобретения, относится к олигомеру или полимеру рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), или к их миметикам. Этот термин также относится к олигонуклеиновым основаниям, состоящим из природных нуклеотидов, сахаров и ковалентных между нуклеозидных связей (остова), так же как к олигонуклеотидам, имеющим неестественные модификации.

В рамках изобретения, "эпитоп" относится к участку белка (например, человеческого белка MASP-2), с которым связывается антитело. "Перекрывающиеся эпитопы" включают по меньшей мере один (например, два, три, четыре, пять или шесть) общий аминокислотный остаток(остатки), включая линейные и не линейные эпитопы.

В рамках изобретения, термины "полипептид", "пептид" и "белок" использованы взаимозаменяемо и означают любую связанную пептидными связями цепь аминокислот, независимо от длины или пост-

трансляционной модификации. Белок MASP-2, описанный в настоящем описании, может содержать или представлять собой белки дикого типа, или может представлять собой варианты, имеющие не более чем 50 (например, не более чем одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 50) консервативных аминокислотных замен. Консервативные замены, как правило, включают замены внутри следующих групп: глицин и аланин; валин, изолейцин и лейцин; аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; аспарагин, глутамин, серин и треонин; лизин, гистидин и аргинин; и фенилаланин и тирозин.

В некоторых вариантах осуществления, человеческий белок MASP-2 может иметь аминокислотную последовательность, которая является на или является более чем на 70 (например, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100) % идентичной человеческому белку MASP-2, имеющему аминокислотную последовательность, указанную на SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления, пептидные фрагменты могут иметь длину по меньшей мере 6 (например, по меньшей мере 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или 600, или более) аминокислотных остатков (например, по меньшей мере 6 последовательных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 5). В некоторых вариантах осуществления, антигенный пептидный фрагмент человеческого белка MASP-2 имеет длину менее чем 500 (например, менее чем 450, 400, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7 или 6) аминокислотных остатков (например, менее чем 500 последовательных аминокислотных остатков из любой из SEQ ID NO: 5).

Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности определяют как процент аминокислот в последовательности-кандидате, которые являются идентичными аминокислотам в эталонной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения пропусков, при необходимости, для достижения максимальной процентной идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента идентичности последовательностей можно осуществлять различными способами, находящимися в компетенции специалиста в данной области, например, с использованием публично доступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR). Подходящие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания на протяжении полной длины сравниваемых последовательностей, можно определять известными способами.

## II. Обзор изобретения.

Лектины (MBL, М-фиколин, Н-фиколин, L-фиколин и CL-11) представляют собой специфические узнающие молекулы, запускающие врожденную систему комплемента, и эта система включает лектиновый путь инициации и ассоциированную усиливающую петлю терминального пути, которая усиливает иницированную лектином активацию терминальных эффекторных молекул комплемента. C1q представляет собой специфическую узнающую молекулу, запускающую приобретенную систему комплемента, и эта система включает классический путь инициации и ассоциированную усиливающую петлю терминального пути, которая усиливает иницированную C1q активацию терминальных эффекторных молекул комплемента. Авторы настоящего изобретения обозначили эти две главные системы активации комплемента как зависимую от лектина систему комплемента и зависимую от C1q систему комплемента, соответственно.

В дополнение к ее важной роли в иммунной защите, система комплемента вносит вклад в повреждение тканей при многих клинических состояниях. Таким образом, существует настоятельная необходимость разработки терапевтически эффективных ингибиторов комплемента для предотвращения этих неблагоприятных эффектов. С пониманием того, что является возможным ингибировать опосредованный лектином путь MASP-2, в то же время оставляя классический путь интактным, приходит понимание того, что является очень желательным специфически ингибировать только систему активации комплемента, вызывающую конкретную патологию, без полного отключения иммунозащитных способностей комплемента. Например, при состояниях заболевания, при которых активация комплемента опосредована преимущественно зависимой от лектина системой комплемента, может предоставлять преимущества специфическое ингибирование только этой системы. Это может оставлять зависимую от C1q систему активации комплемента интактной для управления активностью иммунного комплекса и для способствования защите хозяина против инфекции.

Предпочтительным белковым компонентом для нацеливания в разработке лекарственных средств для специфического ингибирования зависимой от лектина системы комплемента является MASP-2. Из всех известных белковых компонентов зависимой от лектина системы комплемента (MBL, Н-фиколина, фиголина М, L-фиголина, MASP-2, C2 C9, фактора В, фактора D и пропердина), только MASP-2 является как уникальным для зависимой от лектина система комплемента, так и необходимым для функциони-

рования системы. Лектины (MBL, Н-фиколин, М-фиколин, L-фиколин и CL-11) также являются уникальными компонентами в зависимой от лектина системе комплемента. Однако, потеря любого одного из этих лектиновых компонентов необязательно ингибирует активацию системы из-за избыточности лектинов. Было бы необходимым ингибировать все пять лектинов для гарантированного ингибирования зависимой от лектина системы активации комплемента. Кроме того, поскольку известно также, что MBL и фиколины имеют независимую от комплемента опсоническую активность, ингибирование функции лектина может привести к потере этого обеспечивающего преимущества механизма защиты хозяина против инфекции. В отличие от этого, эта независимая от комплемента опсоническая активность лектина может оставаться интактной, если MASP-2 является мишенью для ингибирования. Дополнительным преимуществом MASP-2 в качестве терапевтической мишени для ингибирования зависимой от лектина системы активации комплемента является то, что концентрация MASP-2 в плазме является одной из самых низких по сравнению с другими белками комплемента ( $\approx 500$  нг/мл); таким образом, соответственно, низкие концентрации высокоафинных ингибиторов MASP-2 могут являться достаточными для получения полного ингибирования (Moller Kristensen, M., et al., *J. Immunol Methods* 282:159-167, 2003).

Как описано в настоящем описании, неожиданно определили, что ингибитор MASP-2, такой как антитело против MASP-2 человека (OMS646), является по меньшей мере настолько же эффективным, как антитело против VEGF, при уменьшении хориоидальной неоваскуляризации (CNV) в модели связанной с возрастом дегенерации желтого пятна (AMD) на мышцах при системной доставке мышам. Таким образом, ожидают, что ингибирующее MASP-2 средство, такое как ингибирующее MASP-2 антитело, может также являться эффективным в качестве антиангиогенного средства для использования для ингибирования зависимой от ангиогенеза злокачественной опухоли, например, такой как зависимая от ангиогенеза злокачественная опухоль, выбранная из группы, состоящей из солидной опухоли (опухолей), передающихся через кровь опухолей, карциноидных опухолей высокого риска и метастазов опухолей. Ожидают также, что ингибирующее MASP-2 средство, такое как ингибирующее MASP-2 антитело, может являться эффективным в качестве антиангиогенного средства для ингибирования зависимой от ангиогенеза доброкачественной опухоли, например, такой как зависимая от ангиогенеза доброкачественная опухоль, выбранная из группы, состоящей из гемангиом, невринома слухового нерва, нейрофибром, трахом, карциноидных опухолей и пиогенных гранулем. Ожидают также, что ингибирующее MASP-2 средство, такое как ингибирующее MASP-2 антитело, может являться эффективным в качестве антиангиогенного средства для использования в ингибировании ангиогенеза при AMD и других офтальмологических ангиогенных заболеваниях или нарушениях, таких как увеит, меланома глаза, неоваскуляризация роговицы, первичный птеригий (роговицы), стромальный кератит HSV, индуцированный HSV-1 лимфангиогенез роговицы, пролиферативная диабетическая ретинопатия, ретинопатия недоношенных, окклюзия вен сетчатки, отторжение трансплантата роговицы, неоваскулярная глаукома и покраснение радужки.

III. Роль MASP-2 в зависимых от ангиогенеза заболеваниях и состояниях, и терапевтические способы с использованием ингибирующих MASP-2 средств.

Зависимые от ангиогенеза заболевания или состояния возникают в результате того, что новые кровеносные сосуды избыточно растут в неподходящих локализациях (таких как пигментный эпителий сетчатки), или того, что новые кровеносные сосуды имеют нежелательные характеристики, такие как подтекание, и включают такие заболевания, как злокачественная опухоль и заболевания глаз. При этих состояниях, новые кровеносные сосуды подпитывают пораженную заболеванием ткань, могут разрушать новую ткань и, в случае злокачественной опухоли, новые кровеносные сосуды позволяют опухоли расти, и клеткам опухолей входить в кровоток и метастазировать к другим органам. Избыточный ангиогенез может возникать, когда пораженные заболеванием клетки продуцируют аномальные количества ангиогенных факторов роста, таким образом, преодолевая эффекты природных ингибиторов ангиогенеза.

Потенциальная роль активации комплемента в ангиогенезе показана при связанной с возрастом дегенерации желтого пятна (AMD). AMD представляет собой связанное с потерей зрения заболевание, поражающее миллионы взрослых людей, хотя последствия биохимических, клеточных и/или молекулярных событий, приводящих к развитию AMD, мало понятны. AMD приводит к прогрессирующему разрушению желтого пятна, что связано с формированием внеклеточных отложений, богатых белками и липидами, называемых друзами, локализованных внутри и вокруг желтого пятна, позади сетчатки и между пигментным эпителием сетчатки (RPE) и хороидом. Друзы являются характерными для ранней и промежуточной AMD. Многие пациенты подвержены прогрессированию до AMD на поздних стадиях, которая включает две формы, географическую атрофию и неоваскулярную или "влажную" AMD. Термин "сухая AMD" в общем относится к ранней и промежуточной AMD, так же как к географической атрофии. В то время как они присутствуют и являются потенциально патологическими при ранних и промежуточных формах заболевания, друзы персистируют также при обеих поздних формах (van Lookeren-Campagne et al., *J. Pathol.* 232:151, 2014; Ambati et al., *Nat. Rev. Immunol.* 13:438, 2013). Недавние исследования выявили, что белки, ассоциированные с воспалением и иммунно-опосредованными процессами, преобладают среди ассоциированных с друзами составляющих. Транскрипты, кодирующие ряд этих молекул, детектированы в клетках сетчатки, RPE и хороида. Эти данные показывают также, что дендритные клетки, являющиеся активными антиген-представляющими клетками, находятся в тесной связи с развитием

друз, и что активация комплемента является ключевым путем, который является активным как внутри друз, так и вдоль поверхности раздела RPE и хориода (Hageman, G.S., et al., *Prog. Retin. Eye Res.* 20:705-732, 2001); Ebrahimi and Handa, *J. Lipid* 2011:802059, 2011). Эти наблюдения показывают, что локальное воспаление, вероятно, является значительным фактором в раннем патогенезе AMD.

В нескольких независимых исследованиях показана сильная ассоциация между AMD и генетическим полиморфизмом в гене фактора комплемента H (CFH), где вероятность AMD увеличена в 7,4 раза у индивидумов, гомозиготных по аллелю риска (Klein, R.J. et al., *Science* 308:362-364, 2005; Haines et al., *Science* 308:362-364, 2005; Edwards et al., *Science* 308:263-264, 2005). Ген CFH картирован на хромосоме 1q31, в области, вовлеченной в AMD по результатам шести независимых сканирований сцепления (см., например, Schultz, D.W., et al., *Hum. Mol. Genet.* 12:3315, 2003). Известно, что CFH является ключевым регулятором системы комплемента. Показано, что CFH на клетках и в кровотоке регулирует активность комплемента посредством ингибирования активации расщепления C3 до C3a и C3b, и посредством инактивации существующего C3b. Накопление C5b-9 наблюдали в мембране Бруха, интеркапиллярных перетяжках и внутри друз у пациентов с AMD (Klein et al., *Science* 308:362-364, 2005). Результаты экспериментов с использованием иммунофлуоресценции позволяют предполагать, что при AMD полиморфизм CFH может вызывать накопление комплемента хориоидальных капиллярах и хориоидальных сосудах (Klein et al., *Science* 308:362-364, 2005).

Ассоциированный с мембраной рецептор комплемента 1 также локализован в друзах, однако он не был детектирован в клетках RPE иммуногистохимически. В отличие от этого, второй ассоциированный с мембраной ингибитор комплемента, мембранный кофакторный белок, присутствует в клетках RPE, ассоциированных с друзами, так же как в малых сферических структурных элементах внутри друз. Показано также, что эти ранее не идентифицированные элементы имеют сильную иммунореакционную способность по отношению к протеолитическим фрагментам компонента комплемента C3, которые характерным образом накапливаются в участках активации комплемента. Предположили, что эти структуры представляют собой остаточный дебрис от дегенерирующих клеток RPE, которые являются мишенями атаки комплемента (Johnson, L.V., et al., *Exp. Eye Res.* 73:887-896, 2001).

Идентификация и локализация этих многочисленных регуляторов комплемента, так же как продуктов активации комплемента (C3a, C5a, C3b, C5b-9) привели исследователей к заключению, что хроническая активация комплемента играет важную роль в процессе биогенеза друз и этиологии AMD (Hageman et al., *Progress Retinal Eye Res.* 20:105-132, 2001). Идентификация продуктов активации C3 и C5 в друзах не дает информации о том, активируется ли комплемент посредством классического пути, лектинового пути или альтернативной усиливающей петли, поскольку, как件яно в соответствии с настоящим изобретением, оба C3 и C5 являются общими для всех трех. Однако, проведены два исследования иммунного мечения друз с использованием антител, специфических для C1q, важного компоненту узнавания для активации классического пути (Mullins et al., *FASEB J.* 14:835-846, 2000; Johnson et al., *Exp. Eye Res.* 70:441-449, 2000). В результате обоих исследований заключили, что иммунное мечение C1q в друзах в основном не обнаружено. Эти отрицательные результаты для C1q позволяют предполагать, что активация комплемента в друзах не происходит посредством классического пути. Кроме того, в исследовании Mullins et al., 2000, опубликовано, что иммунное мечение в друзах составляющих иммунного комплекса (легких цепей IgG, IgM) слабо меняется, дополнительно указывая на то, что классический путь играет незначительную роль в активации комплемента, возникающей в процессе данного заболевания. Таким образом, лектиновый и/или альтернативный пути, по-видимому, ответственны за большую часть, если не за весь опосредованный комплементом биогенез друз, ассоциированный с AMD.

Взаимосвязь между друзами и активацией комплемента является сильной, в частности, при ранней и промежуточной AMD, так же как при географической атрофии. Фактически, крупные и конгломератные друзы представляют значительный фактор риска для географической атрофии (van Lookeren-Campagne et al., там же). Однако, активация комплемента не является ограниченной окружением друз. В двух недавно опубликованных исследованиях оценивали роль комплемента в развитии индуцируемой лазером хориоидальной неоваскуляризации (CNV) у мышей, в модели CNV человека. С использованием иммуногистологических способов, Вога и соавторы (2005) обнаружили значительное накопление продуктов активации комплемента C3b и C5b 9 (MAC) в неоваскулярном комплексе после лазерной терапии (Bora et al., *J. Immunol.* 174:491-497, 2005). Важно, что CNV не развивалась у мышей с генетической недостаточностью C3 (C3<sup>-/-</sup> мышей), необходимого компонента, требуемого для всех путей активации комплемента. Уровни матричной РНК для VEGF, TGF- $\beta_2$ , и  $\beta$ -FGF, трех ангиогенных факторов, вовлеченных в CNV, были повышены в ткани глазного яблока у мышей после индуцированной лазером CNV. Важно, что истощение комплемента приводило к значительному уменьшению уровней РНК этих ангиогенных факторов.

С использованием способов ELISA, Nozaki и коллеги показали, что мощные анафилатоксины C3a и C5a образуются рано в ходе индуцированной лазером CNV (Nozaki et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:2328-2333, 2006). Более того, эти два биоактивных фрагмента C3 и C5 индуцировали экспрессию VEGF после их инъекции в стекловидное тело у мышей дикого типа. В соответствии с этими результатами, Nozaki и коллеги также показали, что генетическая абляция рецепторов для C3a и C5a уменьшает экспрессию VEGF и формирование CNV после лазерного повреждения, и что опосредованная антителами ней-

трализация C3a или C5a или фармакологическая блокада их рецепторов также уменьшает CNV. В предшествующих исследованиях установили, что привлечение лейкоцитов, и особенно макрофагов, играет главную роль в индуцированной лазером CNV (Sakurai et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:3578-85, 2003; Espinosa Heidmann, et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:3586-92, 2003). В своей работе от 2006 г., Nozaki и коллеги опубликовали, что привлечение лейкоцитов значительно уменьшено у мышей C3aR(-/-) и C5aR(-/-).

Лектиновый путь, по-видимому, является ответственным за инициацию каскада реакций комплемента в модели CNV после узнавания природными антителами окислительно модифицированных фосфолипидов на пигментном эпителии сетчатки (Joseph et al. *J. Biol. Chem.* 288:12753, 2013). Альтернативный путь также является критическим для повреждения сетчатки в этой модели, но он один не является достаточным (Rohrer et al., *Mol Immunol.* 48:e1, 2011). Важно, что Kunchithapautham and Rohrer (*J. Biol. Chem.* 286:23717, 2011) показали, что эта активация комплемента запускает секрецию VEGF клетками пигментного эпителия сетчатки. VEGF является ключевым медиатором неоваскуляризации.

Как описано в настоящем описании в примере 12, в мышинной модели дегенерации желтого пятна на мышцах MASP-2(-/-) определили, что уменьшение фоновых уровней VEGF у мышей MASP-2 (-/-) по сравнению с контрольными мышами дикого типа и, кроме того, что в то время как уровни VEGF были значимо увеличены у мышей дикого типа после индуцированного лазером повреждения, неожиданно низкие уровни VEGF наблюдали у мышей MASP-2 (-/-) после индуцированного лазером повреждения. Кроме того, определили, что для мышей MASP-2 (-/-) показано уменьшение на 30% площади CNV после индуцированного лазером повреждения на сутки 7 по сравнению с мышами дикого типа. Как далее описано в примере 14, у мышей, подвергнутых предварительной обработке с использованием моноклонального антитела против MASP-2, которое специфически блокирует лектиновый путь активации комплемента, наблюдали статистически значимое ( $p < 0,01$ ) уменьшение CNV приблизительно на 50% через семь суток после обработки лазером по сравнению с мышами без обработки, показывающее, что это блокирование MASP-2 с использованием ингибитора, такого как моноклональное антитело против MASP-2, оказывает профилактический и/или терапевтический эффект при лечении дегенерации желтого пятна. Как далее описано в примере 16, у мышей, подвергнутых предварительной обработке с использованием моноклонального антитела против MASP-2 человека, которое специфически блокирует лектиновый путь активации комплемента, статистически значимое уменьшение CNV наблюдали при всех тестируемых уровнях дозирования с относительным уменьшением площади CNV в диапазоне от 20% до 50%, в то время как для антитела против VEGF показано умеренное (приблизительно на 15%) относительное уменьшение площади CNV. С учетом неожиданных результатов, описанных в примере 16, показывающих, что ингибитор MASP-2, такой как антитело против MASP-2, является по меньшей мере настолько же эффективным, как антитело против VEGF, в уменьшении CNV в модели AMD на мышцах, при системной доставке, ожидают, что ингибирующее MASP-2 средство может являться эффективным в качестве антиангиогенного средства для использования в лечении зависимых от ангиогенеза заболеваний и состояний, таких как офтальмологические ангиогенные заболевания или нарушения, зависимые от ангиогенеза злокачественные опухоли, и зависимые от ангиогенеза доброкачественные опухоли, как описано ниже.

Ингибиторы MASP-2 для лечения офтальмологических ангиогенных заболеваний или нарушений.

Офтальмологическое ангиогенное заболевание или нарушение представляет собой заболевание или нарушение глаз, при котором аномальный или избыточный ангиогенез происходит в глазу, что может вносить вклад в потерю зрения, геморрагию или другие функциональные нарушения глаз, например, такие как AMD, или офтальмологическое ангиогенное заболевание или нарушение, выбранное из группы, состоящей из увеита, меланомы глаз, неоваскуляризации роговицы, первичного птеригия (роговицы), стромального кератита HSV, индуцированного HSV-1 лимфангиогенеза роговицы, пролиферативной диабетической ретинопатии, диабетического отека желтого пятна, ретинопатии недоношенных, окклюзии вен сетчатки, отторжения трансплантата роговицы, неоваскулярной глаукомы, геморрагии стекловидного тела, вторичной по отношению к пролиферативной диабетической ретинопатии, нейромиелимита зрительного нерва и покраснения радужки (см., например, Rivera et al., *Neonatology* 100(4):343-53, 2011; Hosseini et al., *Cornea* 31:322-34, 2012; Leyvraz et al., *Curr Opin Oncol* 162-9 (2012); Bock et al., *Prog Retin Eye Res* 34:89-124, 2013 и Kim et al., *Am J Pathol* 181(2):376-9, 2012).

Как описано в примерах 14 и 16, в настоящей заявке показано, что системное введение антитела против MASP-2, которое специфически ингибирует лектиновый путь активации комплемента, обеспечивает эффективную терапию для лечения неоваскулярной AMD. Одобренные в настоящее время антиангиогенные лекарственные средства для офтальмологических состояний представляют собой биологические средства, которые ингибируют VEGF. В настоящее время существует три одобренных антиангиогенных лекарственных средства против офтальмологических заболеваний: аптамер против VEGF (пегаптаниб, Макуген®), фрагмент Fab моноклонального антитела, направленного против VEGF-A (ранибузумаб, Люцентис®), и слитый белок, который связывается с VEGF-A, VEGF-B и плацентарным фактором роста (афлиберцепт, Эйлеа®), все из которых вводят посредством инъекции в стекловидное тело. Таким

образом, в отличие от современных и появляющихся лекарственных средств против AMD и других офтальмологических ангиогенных заболеваний и нарушений, требующих инъекции в стекловидное тело, лечение антителом против MASP-2 является эффективным при подкожном введении.

В одном аспекте изобретение, таким образом, относится к способу ингибирования ангиогенеза для лечения офтальмологического ангиогенного заболевания или нарушения, включающему введение композиции, содержащей терапевтически эффективное количество ингибирующего MASP-2 средства в фармацевтическом носителе нуждающемуся в этом индивиду. В некоторых вариантах осуществления, ангиогенное заболевание или нарушение глаз выбрано из группы, состоящей из AMD, увеита, меланомы глаз, неоваскуляризации роговицы, первичного птеригия, стромального кератита HSV, индуцированного HSV-1 лимфангиогенеза роговицы, пролиферативной диабетической ретинопатии, диабетического отека желтого пятна, ретинопатии недоношенных, окклюзии вен сетчатки, отторжения трансплантата роговицы, неоваскулярной глаукомы, геморрагии стекловидного тела, вторичной по отношению к пролиферативной диабетической ретинопатии, нейромиелита зрительного нерва и покраснения радужки. Ингибирующую MASP-2 композицию можно вводить местно в глаз, например, посредством прямой инъекции, промывания или нанесения композиции в форме геля, мази или капли. Альтернативно, ингибирующее MASP-2 средство можно вводить индивиду системно, например, посредством внутриартериального, внутривенного, внутримышечного, ингаляционного, назального, подкожного или другого парентерального введения, или потенциально, посредством перорального введения для непептидергических средств. Композицию ингибирующего MASP-2 средства можно комбинировать с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами, такими как дополнительное антиангиогенное средство. Введение можно повторять, как определено терапевтом, пока состояние не будет устранено или взято под контроль.

Ингибиторы MASP-2 для лечения зависимых от ангиогенеза злокачественных опухолей.

Хорошо установлено, что ангиогенез играет критическую роль в развитии злокачественных опухолей. Опухоли продуцируют проангиогенные факторы для стимуляции неоваскуляризации, которая является одним из основных механизмов прогрессирования солидных опухолей, а также позволяет миграцию клеток опухолей для образования отдаленных метастазов посредством доступа в системный кровоток. Процесс ангиогенеза опухолей впервые активируется, когда растущая опухолевая масса превышает максимальный объем, который можно поддерживать посредством диффузии кислорода и питательных веществ. Наблюдали корреляцию между увеличением ангиогенеза и агрессивностью опухолей (Ferrara et al., *Curr Top Microbiol Immunol* 237:1-30, 1999). Известно также, что ангиогенез играет роль в росте и выживании лейкозов и других гематологических злокачественных новообразований (Ribatti et al., *Neoplasia* 15(3):231-238, 2013; Vacca et al., *Br J Haematol* 87:503-508, 1994). В то время как различные типы клеток вносят вклад в неоваскуляризацию, в общем известно, что эндотелиальные клетки играют центральную роль в процессе ангиогенеза.

Хорошо установлено, что VEGF играет важную роль в ангиогенезе опухолей. VEGF идентифицирован как фактор проницаемости сосудов, секретлируемый клетками опухолей (Mattei et al., *Genomics* 32:168-169, 1996), и показано, что он играет роль в ангиогенезе посредством стимуляции миграции и пролиферации эндотелиальных клеток, так же как посредством стимуляции экспрессии связанных с ангиогенезом генов в эндотелиальных клетках. Например, экспрессия растворимой изоформы 189 VEGF при злокачественных опухолях ободочной кишки, почек и легкого человека сильно ассоциирована с увеличением количества микрососудов, метастазированием злокачественных опухолей и плохими прогнозами (Tokunaga et al., *Br J Cancer* 77:998-1002, 1998; Yuan et al., *J Clin Oncol* 19:432-441, 2001). Высокие уровни изоформы 165 VEGF ассоциированы с плохими показателями выживаемости при раке яичника (Manner et al., *BMC Cancer* 10:139, 2010). В клинических исследованиях фазы 3 показано, что бевацизумаб, гуманизированное моноклональное антитело, ингибирующее VEGF-A, улучшало выживаемость без прогрессирования при раке яичника у женщин (Perren et al., *N Engl J Med* 365:2484-2496, 2011).

В контексте злокачественных опухолей, исследователи традиционно фокусировались на роли комплемента в мечении и уничтожении клеток опухолей. Однако, недавние исследования подвергли сомнению эту точку зрения. Например, Markiewski et al. (*Nature Immunol* vol 9:1225-1235, 2008), опубликовали неожиданное открытие, что белки комплемента C3, C4 и C5a могут способствовать росту опухоли посредством стимуляции иммуносупрессивного микроокружения. Как описано в Markiewski et al., образование C5a комплемента в микроокружении опухоли усиливает рост опухоли посредством супрессии опосредованного CD8+ Т-клетками противоопухолевого ответа. Как дополнительно описано в Markiewski et al., антагонист C5aR, гексапептид AcF(OP(D)ChaWr), являлся настолько же эффективным, как паклитаксел (Таксол) в нарушении роста опухолей у мышей дикого типа, таким образом, устанавливая терапевтическую функцию ингибирования комплемента в лечении злокачественных опухолей. Как описано в Gunn et al. (*J Immunol* 189:2985, 2012), мыши дикого типа с сингенными клетками лимфомы с высокой продукцией C5a имели значительно ускоренное прогрессирование опухолей с большим количеством супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC) в селезенке и общим увеличением количества CD4+ и CD8+ Т-клеток в опухоли, дренирующих опухоль лимфатических узлах и в селезенке. В отличие от этого, несущие опухоль мыши с клетками лимфомы с низкой продукцией C5a имели значительно



уменьшенную опухолевую нагрузку с продуцирующими увеличенное количество интерферона- $\gamma$  CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетками в селезенке и дренирующих опухоль лимфатических узлах. Как дополнительно описано в Corrales et al. (*J Immunol* 189:4674-4683, 2012), обнаружено значительное увеличение количества C5a в плазме от пациентов с немелкоклеточным раком легкого (NSCLC) по сравнению со здоровым индивидом. Определили также, что C5a индуцировал хемотаксис эндотелиальных клеток и формирование кровеносных сосудов. В модели рака легкого на Lewis, клетки сингенных опухолей карциномы легкого мышей Lewis (3LL) росли медленнее у мышей, подвергнутых обработке антагонистом рецептора C5a.

Как дополнительно описано в Nunez-Cruz et al. (*Neoplasia* 14:994-1004, 2012), для оценки роли комплемента в ходе прогрессирования рака яичника, линию мышей с недостаточностью C3 в комплементе, или линию мышей с недостаточностью рецептора C5a (C5aR) в комплементе скрещивали с линией мышей, у которых развивается эпителиальный рак яичника (TgMISIIR-TAg). У мышей TgMISIIR-TAg, имевших полную или частичную недостаточность C3 или полную недостаточность C5aR, либо не развивались опухоли яичника, либо опухоли были небольшими и слабо васкуляризованными по сравнению с однопометными животными с диким типом TgMISIIR-TAg, таким образом, показывая, что недостаточность C3 или C5aR значительно ослабляла фенотип опухоли яичника. Кроме того, показано, что функция эндотелиальных клеток CD31<sup>+</sup> в ангиогенезе была нарушена как у мышей C3 (-/-), так и у мышей C5aR (-/-).

Активация системы комплемента также может быть вовлечена в патогенез злокачественных новообразований. Неоантигены из комплекса комплемента C5b-9, IgG, C3, C4, S-белка/витронектина, фибронектина и макрофагов были локализованы на 17 образцах злокачественных опухолей молочной железы и на 6 образцах доброкачественных опухолей молочной железы с использованием поликлональных или моноклональных антител и способа с стрептавидином-биотином-пероксидазой. Во всех образцах тканей с карциномой на каждой стадии TNM присутствовали накопления C5b-9 на мембранах клеток опухолей, небольшие гранулы на остатках клеток и диффузные накопления в областях некроза (Niculescu, F., et al., *Am. J. Pathol.* 140:1039-1043, 1992). Как дополнительно описано в Rutkowski et al. (*Mol Cancer Res* 8:1453, 2010), для белков комплемента C3, C3a, C5a и MAC описаны потенциальные онкогенные роли, включая ангиогенез, инвазию и миграцию опухолей. Обнаружено, что лектиновый путь активации комплемента являлся значительно усиленным в сыворотке пациентов с колоректальным раком по сравнению со здоровыми индивидами (Ytting et al., 2004, *Scand J. Gastroenterol* 39:674), и опубликовано, что высокие уровни активности MASP-2 являются независимым прогностическим биомаркером, прогнозирующим рецидив и плохую выживаемость при раке толстого кишечника (Ytting et al., *Clin Cancer Res* 11:1441, 2005).

Определили также, что уровни MBL и/или MASP-2 в сыворотке повышены в определенных злокачественных опухолях у детей, включая острый лимфобластный лейкоз (ALL), неходжкинскую лимфому, опухоли ЦНС, и солидные опухоли вне ЦНС (Fisch et al., 2011, *Swiss Med Wkly* 141:w13191). Определили также, что MASP-2 является сверхэкспрессированным в образцах ткани плоскоклеточной карциномы (ESCC) и дисплазии (предзлокачественной) пищевода (Verma et al., *Int J Cancer* 118:2930, 2006).

В дополнение к вышеупомянутым исследованиям, опубликованы многочисленные исследования по ассоциации полиморфизмов MBL и злокачественных опухолей. Например, как обобщено в Swierzko et al., *Mol Immunol* 55:16, 2013, опубликована ассоциация полиморфизмов генов MBL и MBL2 с раком желудка (Baccarelli et al., *International J Cancer* 119:1970-1975, 2006; Scudiero et al., *Clin Chem* 52:1625-1626, 2006; Wang et al., *Digestive Diseases and Sciences* 53:2904-2908, 2008); раком печени (Eurich et al., *Liver International* 31:1006-1012, 2011); раком поджелудочной железы (Rong et al., *BMC Gastroenterology* 10:68, 2010); раком ободочной кишки/колоректальным раком (Ytting et al., *Scan J Gastroenterology* 39:670-674, 2004; Ytting et al., *Scan J Gastroenterology* 73:122-127, 2011; Zanetti et al., *Cancer Res* 72:14 67-1677, 2012); раком яичника (Swierzko et al., *Immunotherapy* 56:959-971, 2007); Nevadunsky et al., *European J of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 163:216-218, 2012); раком молочной железы (Bernig et al., *Carcinogenesis* 28:828-836, 2007); раком легкого (Pine et al., *Journal of NCI* 99:1401-1409, 2007; Olivo-Marston et al., *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 18:3375-3383, 2009); и острым лимфобластным лейкозом (Schmiegelow et al., *Blood* 100:3757-3760, 2002).

Определили также, что компоненты комплемента подвержены повышающей регуляции в биологических жидкостях от пациентов-людей со злокачественными опухолями, как показано ниже в табл. 1.

Таблица 1

Компоненты комплемента, подверженные повышающей регуляции в биологических жидкостях от пациентов-людей со злокачественными опухолями

Компонент комплемента	Злокачественная опухоль	Биологический образец	Ссылка
C3a/C3a(desArg)	Молочной железы	Сыворотка	Fan et al., J Can Res Clin Oncol 136:1243, 2010; Solassol et al., Oncogene 29:550, 2010; Li et al., Clin Chem 51:2229, 2005
C3a/C3a(desArg)	Связанная с HCV Печеночно-клеточная карцинома	Сыворотка	Kanmura et al., J Gastroenterol 45:459, 2010; Lee et al., Proteomics 6:2865, 2006
C3a/C3a(desArg)	Колоректальная	Сыворотка	Fenz et al., Proteomics Clin Appl 1:536, 2007; Habermann et al., Gastroenterol 131:1020, 2006
C3a	Хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL)	Сыворотка	Miguet et al., J Proteome Res 5:2258, 2006;
C4a	CLL	Сыворотка	Miguet et al., J Proteome Res 5:2258, 2006;
C3a	Яичников	Асциты по сравнению сывороткой	поVjorge et al., Br J Cancer 92(5):895-905, 2005
C5b-9	Яичников	Асциты по сравнению сывороткой	поVjorge et al., Br J Cancer 92(5):895-905, 2005
C5a	Немелкоклеточный рак легкого (NSCLC)	Сыворотка	Corrales et al., J Immunol 189:4674, 2012
C1 ингибитор, CD59, CD46, Фактор Н	Яичников	Асциты по сравнению сывороткой	поVjorge et al., Br J Cancer 92(5):895-905, 2005
Фактор Н	Острый миелоидный лейкоз	Сыворотка	Lee et al., Electrophoresis 33:1863, 2012
Фактор Н	Легкого	Бронхоальвеолярный лаваж (BAL), мокрота	Pio et al., Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 19:2665, 2010

Кроме того, активация комплемента может являться следствием химиотерапии или радиотерапии, и таким образом, ингибирование активации комплемента можно использовать в качестве вспомогательной терапии в лечении злокачественных новообразований для уменьшения ятрогенного воспаления. Когда химиотерапия и радиотерапия предшествовали хирургическому вмешательству, накопления C5b-9 были более интенсивными и обширными. Накопления C5b-9 отсутствовали во всех образцах доброкачественных новообразований. Белок S/витронектин присутствовал в форме фибриллярных отложений в соединительнотканном матриксе и в форме диффузных отложений вокруг клеток опухолей, менее интенсивных и обширных, чем фибронектин. Накопления IgG, C3, и C4 присутствовали только в образцах карциномы. Присутствие накоплений C5b-9 является показателем активации комплемента и его последующих патогенетических эффектов при раке молочной железы (Niculescu, et al., Am. J. Pathol. 140:1039 1043, 1992).

С учетом данных, описанных в примере 16, о том, что системное введение антитела против MASP-2, специфически ингибирующего лектиновый путь активации комплемента, ингибирует неоваскуляризацию по меньшей мере настолько же эффективно, как антитело против VEGF, ожидают, что системная доставка ингибирующего MASP-2 средства, может являться эффективной для ингибирования ангиогенеза опухолей, таким образом, уменьшая рост и/или метастазирование опухолей у индивида, страдающего зависимой от ангиогенеза злокачественной опухолью.

Зависимые от ангиогенеза злокачественные опухоли включают злокачественную опухоль эпителиального происхождения или нейронального происхождения, или карциному, или солидную опухоль или саркому, или жидкую опухоль, такую как лейкоз или лимфома. Любая злокачественная опухоль, для которой уже известно лечение или находится в разработке лечение с использованием ангиостатического соединения (например, антагониста VEGF) включена в объем способов по изобретению. Предпочтительные злокачественные опухоли в этом контексте включают: колоректальные злокачественные опухоли, злокачественные опухоли молочной железы (включая метастазирующий рак молочной железы, воспалительную карциному молочной железы), легкого, почек, печени, пищевода, яичников, поджелудочной железы, предстательной железы и желудка, так же как глиому, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта, лимфому, меланому и карциноидные опухоли (база данных клинических исследова-

ний NCI: найдена на [www\\_cancer\\_gov\\_clinicaltrials/search](http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search), доступ от 3/25/2014). Показано, что многие из этих злокачественных опухолей являлись отвечающими на лечение бевацизумабом (Авастином®), гуманизированным моноклональным антителом, блокирующим связывание VEGF с его рецепторами и ингибирующим ангиогенез опухолей (например, Amit et al., PLoS One 8(1):e51780 (2013).

В соответствии с вышеизложенным, другой аспект изобретения относится к способам ингибирования ангиогенеза опухолей и/или метастазирования опухолей у индивида, страдающего зависимой от ангиогенеза злокачественной опухолью. Этот способ включает введение композиции, содержащей количество ингибитора MASP-2, эффективного для ингибирования ангиогенеза опухолей и/или метастазирования опухолей, индивиду, страдающему зависимой от ангиогенеза злокачественной опухолью. В некоторых вариантах осуществления, индивид страдает зависимой от ангиогенеза злокачественной опухолью, выбранной из группы, состоящей из колоректальной злокачественной опухоли, злокачественной опухоли молочной железы, легкого, почек, печени, пищевода, яичников, поджелудочной железы, предстательной железы и желудка, так же как глиомы, стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта, лимфомы, меланомы и карциноидной опухоли. В некоторых вариантах осуществления, зависимые от ангиогенеза злокачественные опухоли относятся к злокачественным опухолям типов, которые, как ожидают, получают преимущество от лечения средством против VEGF, таким как антитело против VEGF Авастин® (бевацизумаб, Genentech, CA), например, таким как любая злокачественная опухоль, для которой уже известно лечение или находится в разработке лечение с использованием ангиостатического соединения (например, антагонист VEGF), включая злокачественные опухоли на поздних стадиях, метастазирующие в печень, меланому, рак яичника, нейробластому, рак поджелудочной железы, печеночно-клеточную карциному, рак эндометрия, рак предстательной железы, ангиосаркому, метастазирующую или неоперабельную ангиосаркому, рецидивирующие опухоли стромы полового тяжа яичников, рак пищевода, рак желудка, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, рецидивирующий или метастазирующий рак головы и шеи, неопластический менингит, рак шейки матки, рак тела матки, перитонеальный карциноматоз на поздних стадиях, глиосаркому, нейроэндокринную карциному, экстракраниальную саркому Юинга, острый миелоидный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, интракраниальную менингиому, саркому Капоши на поздних стадиях, мезотелиому, злокачественную опухоль желчевыводящих путей, метастазирующие карциноидные опухоли и злокачественную опухоль мочевыводящих путей на поздних стадиях. Предпочтительные злокачественные опухоли в этом контексте включают: колоректальные злокачественные опухоли, злокачественные опухоли молочной железы (включая метастазирующий рак молочной железы, воспалительную карциному молочной железы), легкого, почек, печени, пищевода, яичников, поджелудочной железы, предстательной железы и желудка, так же как глиому, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта, лимфому, меланому и карциноидные опухоли.

Ингибирующую MASP-2 композицию можно вводить местно в область опухоли(опухолей), например, посредством местного введения композиции в ходе хирургического вмешательства или местной инъекции, либо напрямую, либо удаленно, например, посредством катетера. Альтернативно, ингибирующее MASP-2 средство можно вводить пациенту системно, например, посредством внутриартериального, внутривенного, внутримышечного, ингаляционного, назального, подкожного или другого парентерального введения, или потенциально, посредством перорального введения для непептидергических средств. Композицию ингибирующего MASP-2 средства можно комбинировать с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами, такими как дополнительное антиангиогенное средство и/или дополнительное химиотерапевтическое средство. Введение можно повторять, как определено терапевтом, пока состояние не будет устранено или взято под контроль.

С учетом данных настоящего исследования, показывающих, что OMS646 является по меньшей мере настолько же эффективным, как антитело против VEGF, для уменьшения CNV при системной доставке мышам при всех тестируемых уровнях дозирования, ожидают также, что ингибирующее MASP-2 средство, такое как OMS646, может также являться эффективным в качестве антиангиогенного средства для использования для ингибирования зависимого от ангиогенеза состояния, такого как миелофиброз и наследственная геморагическая телеангиэктазия.

#### IV. Ингибирующие MASP-2 средства.

В различных аспектах, настоящее изобретение относится к способам ингибирования неблагоприятных эффектов ангиогенеза посредством введения ингибирующего MASP-2 средства нуждающемуся в этом пациенту. Ингибирующие MASP-2 средства вводят в количествах, эффективных для ингибирования зависимой от MASP-2 активации комплемента у живого индивида. Для практического осуществления этого аспекта изобретения, репрезентативные ингибирующие MASP-2 средства включают: молекулы, ингибирующие биологическую активность MASP-2 (такие как низкомолекулярные ингибиторы, антитела против MASP-2 или блокирующие пептиды, которые взаимодействуют с MASP-2 или препятствуют белок-белковому взаимодействию), и молекулы, уменьшающие экспрессию MASP-2 (такие как молекулы антисмысловой нуклеиновой кислоты MASP-2, специфические для MASP-2 молекулы РНКи и рибозимы MASP-2), таким образом, предотвращая активацию посредством MASP-2 лектинового пути ком-

племента. Ингибирующие MASP-2 средства можно использовать отдельно в качестве первичной терапии или в комбинации с другими терапевтическими средствами в качестве вспомогательной терапии для увеличения терапевтического преимущества использования другого медицинского лечения.

Ингибирование зависимой от MASP-2 активации комплемента характеризуется по меньшей мере одним из следующих изменений в компоненте системы комплемента, которые происходят в результате введения ингибирующего MASP-2 средства в соответствии со способами по изобретению: ингибирование образования или продукции продуктов зависимой от MASP-2 системы активации комплемента C4b, C3a, C5a и/или C5b 9 (MAC) (измеренных, например, как описано в примере 2), уменьшение расщепления C4 и накопления C4b (измеренных, например, как описано в примере 2), или уменьшение расщепления C3 и накопления C3b (измеренных, например, как описано в примере 2).

В соответствии с настоящим изобретением, используют ингибирующие MASP-2 средства, которые являются эффективными для ингибирования ангиогенеза и имеют подающуюся детекции антиангиогенную активность и/или индуцируют уменьшение неоангиогенеза. В контексте изобретения, антиангиогенная активность может включать по меньшей мере одно или несколько из следующего: снижение или уменьшение неоангиогенеза, нормализация сосудов, и/или уменьшение количества сосудов в патогенной области.

Неоангиогенез и оценку антиангиогенного средства, такого как ингибирующее MASP-2 средство, можно детектировать с использованием любого способа, известного специалисту в данной области. Например, неоангиогенез и оценку антиангиогенного средства можно оценивать в модели CNV у животных с индуцированным лазером повреждением (как описано в примерах 12, 14 и 16 в настоящем описании), или *in situ* у пациента или в опухоли посредством неинвазивных способов, таких как визуализация посредством ПЕТ (позитронной эмиссионной томографии), MRI (магнитно-резонансной томографии), DCE-MRI (MRI с динамическим контрастным усилением) или СТ (компьютерной томографии). Эти способы можно использовать для мониторинга опухолевой нагрузки на основании увеличенного подтекания сети кровеносных сосудов в опухолях. С использованием MRI или ПЕТ, можно отслеживать присутствие маркеров ангиогенеза, например, таких как,  $\alpha 5\beta 3$ -интегрин, VEGF или bFGF в плазме.

Альтернативно, неоангиогенез можно оценивать с использованием биопсии опухолей или срезов, полученных из патогенной области от пациента, страдающего зависимым от ангиогенеза состоянием, и последующих иммуногистохимических анализов эндотелиальных клеток для оценки из активности и ее сравнения с активностью нормальных эндотелиальных клеток от здорового индивида или эндотелиальных клеток от пациента, но выделенных из другого участка организма. Такие иммуногистохимические анализы можно выполнять с использованием антител против пан-эндотелиальных клеток, таких как антитела против CD31 и против CD34, для оценки плотности микрососудов. Срезы тканей можно окрашивать с использованием маркеров эндотелиальных клеток, в комбинации с маркерами пролиферации, для исследования соотношения между эндотелиальными клетками опухоли и пролиферирующими клетками опухоли в ткани. Примерами эндотелиальных маркеров являются CD31 и CD34. Одним из примеров маркера пролиферации является Ki67, который является превосходным маркером для определения растущей фракции из данной популяции клеток. Фракция положительных по Ki-67 клеток опухолей (индекс мечения Ki-67) часто коррелирует с клиническим течением злокачественной опухоли. Можно оценивать плотность микрососудов (MVD), например, в срезе опухоли, окрашенном с использованием антитела против CD31, и с использованием интенсивности окрашивания для количественной оценки MVD. Количественную оценку MVD предпочтительно выполняют посредством подсчета положительно окрашенных структур просвета в четырех - пяти репрезентативных изображениях на срез опухоли. Уменьшение, предпочтительно, статистически значимое уменьшение, MVD, оцененное по меньшей мере в четырех - пяти репрезентативных изображениях на срез опухоли, предпочтительно, наблюдают в качестве показателя того, что введенная молекула имеет антиангиогенную активность или является способной уменьшать неоангиогенез.

Неоангиогенез можно также оценивать с использованием клеток, предпочтительно, эндотелиальных клеток, из опухоли, от здорового индивида или из линий эндотелиальных клеток. Эндотелиальные клетки из опухоли предпочтительно обозначают как эндотелий опухоли. Эндотелиальные клетки опухоли можно выделять посредством FACS (сортировки клеток с активацией флуоресценции) из ткани опухоли с использованием CD31 в качестве эндотелиального маркера. Это можно проводить, как описано в van Beijnum et al., Nat Protoc. 3(6):1085-91, 2008. Предпочтительными эндотелиальными клетками для оценки неоангиогенеза *in vitro* являются HUVEC и RF24. Оценку активности неоангиогенеза *in vitro* можно проводить с использованием анализа с MTS (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолием) для оценки пролиферативной активности эндотелиальных клеток. Альтернативно, можно использовать другие анализы жизнеспособности, известные специалисту в данной области, такие как анализы с MTT (бромидом 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия), кристаллическим фиолетовым и WST-1 (растворимым в воде тетразолием).

Кроме того, можно использовать другие типы анализов активности ангиогенеза, такие как анализ прорастания сфероидов и анализ формирования трубочек в матригеле. В анализе формирования трубочек в матригеле, клетки, особенно эндотелиальные клетки, высевают на синтетический полунатуральный

гелевый матрикс (такой как Матригель из BD Biosciences или коллаген-гель, или, в некоторых случаях, фибриновые гели). В обоих анализах, используют эндотелиальные клетки, предпочтительно, HUVEC. После определенного периода времени, в зависимости от условий культивирования клеток, клетки начинают формировать подобные трубчатой структуре. Формирование подобных трубчатой структур рассматривают как первую стадию на пути образования новых сосудов. Считываемый параметр представляет собой количество сосудов-узлов на единицу площади. Для анализа прорастания сфероидов, клеточные сфероиды (например, эндотелиальных клеток) помещают в гель (например, матригель и коллагеновые гели). После определенного периода времени, можно наблюдать формирование отростков. Степень прорастания рассматривают как критерий для оценки ангиогенного потенциала клеток. Считываемый параметр представляет собой количество отростков на сфероид. Антиангиогенная активность может присутствовать, когда количество отростков на сфероид снижается или уменьшается в обработанных клетках в течение данного периода времени по сравнению с количеством отростков на сфероид в необработанных клетках. Снижение или уменьшение может представлять собой уменьшение на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%. Антиангиогенная активность в ткани опухоли также может присутствовать, когда визуализируют нормализацию сосудов и/или когда количество сосудов в патогенной области уменьшается.

В предпочтительном варианте осуществления, как только обнаруживают уменьшение количества сосудов в патогенной области по сравнению с количеством сосудов на начало лечения, присутствует поддающаяся детекции антиангиогенная активность. Уменьшение может представлять собой поддающуюся детекции уменьшение количества сосудов в патогенной области или уменьшение на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% количества сосудов в патогенной области. Патогенная область представляет собой область опухоли, включая окружающую ткань, локализованную близко к области опухоли. Близко в этом контексте может означать вплоть до нескольких сантиметров.

Нормализация сосудов предпочтительно представляет собой изменение в трехмерной структуре сосуда или микрососуда. Например, патологические сосуды или микрососуды, ассоциированные с активностью неоангиогенеза в эндотелии опухоли, могут являться менее равномерными и/или могут выглядеть более извилистыми, и/или могут выглядеть более подтекающими, чем контрольный сосуд или микрососуд. Контрольный сосуд может представлять собой сосуд от здорового индивидуума или сосуд от пациента, но не локализованный в патогенной области указанного пациента. В предпочтительном варианте осуществления, как только трехмерная структура сосуда начинает выглядеть более равномерной, менее извилистой и/или менее подтекающей, чем контрольный сосуд, говорят, что детектирована антиангиогенная активность.

Предпочтительно, меньше неравномерных, извилистых и/или подтекающих сосудов детектируют в патогенной области, чем на начало лечения. Более предпочтительно, меньше означает меньше на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или меньше на 100%. Наиболее предпочтительно, неравномерных, извилистых и/или подтекающих сосудов не детектируют в патогенной области. Нормализацию сосудов и/или количество сосудов в патогенной области можно оценивать с использованием неинвазивного способа визуализации, такого как визуализация PET, MRI или CT.

В случае заболевания или состояния глаз, ассоциированного с неоангиогенезом, разработано несколько анализов для оценки поддающейся детекции антиангиогенной активности и/или снижения или уменьшения неоангиогенеза, индуцированного лекарственным средством, подлежащим тестированию, таким как ингибирующее MASP-2 средство. В этих различных моделях заболевания, ангиогенез можно запускать посредством различных стимулов, таких как физическое повреждение (индуцированный лазером разрыв мембраны Бруха) (Shen et al., 2006 Gene therapy 13:225-234), или посредством сверхэкспрессии специфических факторов роста кровеносных сосудов, таких как VEGF у трансгенных мышей (Miki et al., 2009, Ophthalmology 2009 September 116(9):1748-1754). Если поддающуюся детекции антиангиогенную активность и/или снижение или уменьшение ангиогенеза оценивают с использованием ингибирующего MASP-2 средства, говорят, что такое ингибирующее MASP-2 средство используют в качестве лекарственного средства для предотвращения, лечения, возвращения к прежнему состоянию, излечения и/или задержки ангиогенеза или заболевания или состояния, ассоциированного с ангиогенезом.

Оценку неоангиогенеза и/или антиангиогенной активности можно проводить периодически, например, каждую неделю или каждый месяц. Увеличение/уменьшение неоангиогенеза и/или присутствие антиангиогенной активности можно, таким образом, оценивать периодически, например, каждую неделю или месяц. Эту оценку предпочтительно проводят в нескольких временных точках для данного индивида или в одной или нескольких временных точках для данного индивида и здорового контрольного индивидуума. Оценку можно проводить в регулярные интервалы времени, например, каждую неделю, или каждый месяц. Когда одна из оценок неоангиогенеза или ангиогенной активности, связанной с ингибирующим MASP-2 средством, приводит к обнаружению уменьшения неоангиогенеза или присутствия антиангиогенной активности, говорят, что ингибирующее MASP-2 средство, такое как антитело против MASP-2, имеет поддающуюся детекции антиангиогенную активность и/или индуцирует снижение или уменьшение неоангиогенеза.

Поддающаяся детекции уменьшение активности неоангиогенеза и/или присутствие антиангиоген-

ной активности, предпочтительно, является детектированным, когда, по меньшей мере для одной временной точки, детектировано уменьшение неоангиогенеза и/или присутствие антиангиогенной активности. Предпочтительно, уменьшение неоангиогенеза и/или присутствие антиангиогенной активности детектируют по меньшей мере для двух, трех, четырех, пяти временных точек.

Ингибирующие MASP-2 средства, которые можно использовать в практическом осуществлении этого аспекта изобретения, включают, например, антитела против MASP-2 и их фрагменты, ингибирующие MASP-2 пептиды, малые молекулы, растворимые рецепторы и ингибиторы экспрессии MASP-2. Ингибирующие MASP-2 средства могут ингибировать зависимую от MASP-2 систему активации комплемента посредством блокирования биологической функции MASP-2. Например, ингибирующее средство может эффективно блокировать белок-белковые взаимодействия MASP-2, создавать помехи для димеризации или сборки MASP-2, блокировать связывание  $Ca^{2+}$ , создавать помехи для активного участка сериновой протеазы MASP-2, или может уменьшать экспрессию белка MASP-2.

В некоторых вариантах осуществления, ингибирующие MASP-2 средства избирательно ингибируют активацию комплемента MASP-2, оставляя зависимую от C1q систему активации комплемента функционально интактной.

В одном варианте осуществления, ингибирующее MASP-2 средство, которое можно использовать в способах по изобретению, представляет собой специфическое ингибирующее MASP-2 средство, которое специфически связывается с полипептидом, содержащим SEQ ID NO: 6, с аффинностью, по меньшей мере в десять раз более высокой, чем для других антигенов в системе комплемента. В другом варианте осуществления, ингибирующее MASP-2 средство специфически связывается с полипептидом, содержащим SEQ ID NO: 6, с аффинностью связывания, по меньшей мере в 100 раз более высокой, чем для других антигенов в системе комплемента. В одном варианте осуществления, ингибирующее MASP-2 средство специфически связывается по меньшей мере с одним из (i) домена CCP1-CCP2 (ак 300-431 из SEQ ID NO: 6) или домена сериновой протеазы MASP-2 (ак 445-682 из SEQ ID NO: 6) и ингибирует зависимую от MASP-2 активацию комплемента. В одном варианте осуществления, ингибирующее MASP-2 средство представляет собой моноклональное антитело против MASP-2, или его фрагмент, которые специфически связываются с MASP-2. Аффинность связывания ингибирующего MASP-2 средства можно определять с использованием подходящего анализа связывания.

Полипептид MASP-2 имеет молекулярную структуру, сходную с MASP-1, MASP-3, и C1r и C1s, протеазами C1 системы комплемента. Молекула кДНК, представленная в SEQ ID NO: 4, кодирует репрезентативный пример MASP-2 (состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5), и обеспечивает образование человеческого полипептида MASP-2 с лидерной последовательностью (ак 1-15), которая отщепляется после секреции, приводя к образованию зрелой формы человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 6). Как показано на фиг. 2, ген MASP-2 человека содержит двенадцать экзонов. кДНК MASP-2 человека кодирована экзонами B, C, D, F, G, H, I, J, K и L. Альтернативный сплайсинг приводит к образованию белка 20 кДа, названного ассоциированным с MBL белком 19 ("MAP19", также обозначенного как "sMAP") (SEQ ID NO: 2), кодированного (SEQ ID NO: 1), образованного из экзонов B, C, D и E, как показано на фиг. 2. Молекула кДНК, представленная в SEQ ID NO: 50, кодирует мышинный MASP-2 (состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 51) и обеспечивает образование мышинового полипептида MASP-2 с лидерной последовательностью, которая отщепляется после секреции, приводя к образованию зрелой формы мышинового MASP-2 (SEQ ID NO: 52). Молекула кДНК, представленная в SEQ ID NO: 53, кодирует крысиный MASP-2 (состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 54) и обеспечивает образование крысиного полипептида MASP-2 с лидерной последовательностью, которая отщепляется после секреции, приводя к образованию зрелой формы крысиного MASP-2 (SEQ ID NO: 55).

Специалисту в данной области понятно, что последовательности, описанные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 53, представляют собой единичные аллельные варианты человеческого, мышинового и крысиного MASP-2, соответственно, и что можно ожидать появления аллельных вариантов и альтернативного сплайсинга. Аллельные варианты нуклеотидных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 53, включая последовательности, содержащие молчащие мутации, и последовательности, в которых мутации вызывают изменения аминокислотных последовательностей, включены в объем настоящего изобретения. Аллельные варианты последовательности MASP-2 можно клонировать с помощью зондов из библиотек кДНК или геномных библиотек от различных индивидуумов, в соответствии со стандартными способами.

Домены человеческого белка MASP-2 (SEQ ID NO: 6) показаны на фиг. 1 и 2A, и включают N-концевой домен C1r/C1s/Vegf морского ежа/ костного морфогенетического белка (CUB1) (ак 1-121 из SEQ ID NO: 6), домен, подобный эпидермальному фактору роста (ак 122-166), второй домен CUB1 (ак 167-293), так же тандем доменов контрольных белков комплемента и домен сериновой протеазы. Альтернативный сплайсинг гена MASP-2 приводит к образованию MAP19, показанного на фиг. 1. MAP19 представляет собой неферментный белок, содержащий N-концевую область CUB1-EGF из MASP-2 с четырьмя дополнительными остатками (EQSL), происходящими из экзона E, как показано на фиг. 1.

Показано, что некоторые белки связываются или взаимодействуют с MASP-2 посредством белок-

белковых взаимодействий. Например, известно, что MASP-2 связывается и формирует зависимые от  $\text{Ca}^{2+}$  комплексы с лектиновыми белками MBL, Н-фиколином и L-фиколином. Показано, что каждый комплекс MASP-2/лектин активирует комплемент посредством зависимого от MASP-2 расщепления белков C4 и C2 (Ikeda, K., et al., J. Biol. Chem. 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M., et al., J. Exp. Med. 176:1497-2284, 2000; Matsushita, M., et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002). Исследования показали, что домены CUB1-EGF из MASP-2 являются необходимыми для ассоциации MASP-2 с MBL (Thielens, N.M., et al., J. Immunol. 166:5068, 2001). Показано также, что домены CUB1EGFCUBII опосредуют димеризацию MASP-2, необходимую для формирования активного комплекса MBL (Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 275:30962-30969, 2000). Таким образом, можно идентифицировать ингибирующие MASP-2 средства, которые связываются с участками-мишенями или создают помехи для участков-мишеней MASP-2, как известно, важными для зависимой от MASP-2 активации комплемента.

Антитела против MASP-2.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта изобретения, ингибирующее MASP-2 средство содержит антитело против MASP-2, которое ингибирует зависимую от MASP-2 систему активации комплемента. Антитела против MASP-2, которые можно использовать в этом аспекте изобретения, включают поликлональные, моноклональные или рекомбинантные антитела, происходящие из любого продуцирующего антитела млекопитающего, и могут представлять собой мультиспецифические, химерные, гуманизированные, антиидиотипические антитела и фрагменты антител. Фрагменты антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, фрагменты scFv и одноцепочечные антитела, как описано далее в настоящем описании.

Можно проводить скрининг антител против MASP-2 по способности ингибировать зависимую от MASP-2 систему активации комплемента и по антиангиогенной активности с использованием анализов, описанных в настоящем описании. Несколько антител против MASP-2 описано в литературе, и несколько получены заново, некоторые из которых перечислены ниже в табл. 2. Например, как описано в примерах 10 и 11 в настоящем описании, идентифицированы антитела Fab2 против MASP-2 крысы, которые блокируют зависимую от MASP-2 активацию комплемента, и как показано в примере 14, моноклональное антитело, полученное из антитела Fab2 против MASP-2 крысы, имеет антиангиогенную активность в модели на мышцах индуцированной лазером CNV. Как далее описано в примере 15, и как дополнительно описано в US2012/0282263, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки, идентифицированы полностью человеческие антитела scFv против MASP-2, которые блокируют зависимую от MASP-2 активацию комплемента, и, как описано в примере 16, репрезентативное моноклональное антитело против MASP-2 человека (OMS646), которое блокирует функцию лектинового пути, имеет антиангиогенную активность в модели на мышцах индуцированной лазером CNV. Соответственно, в одном варианте осуществления, ингибирующее MASP-2 средство для использования в способах по изобретению содержит человеческое антитело, например, такое как OMS646. Соответственно, в одном варианте осуществления, ингибирующее MASP-2 средство для использования в композициях и способах по заявленному изобретению, содержит антитело человека, которое связывает полипептид, состоящий из человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 6), где антитело содержит: I) а) переменную область тяжелой цепи, содержащую i) CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из 31-35 из SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 68; и ii) CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из 50-65 из SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 68; и iii) CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из 95-102 из SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 68; и б) переменную область легкой цепи, содержащую: i) CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из 24-34 из любой из SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 71; и ii) CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из 50-56 из любой из SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 71; и iii) CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из 89-97 из любой из SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 71; или II) их вариант, в ином отношении идентичный указанным переменным доменам, за исключением вплоть до 6 суммарных аминокислотных замен внутри указанных областей CDR указанной переменной области тяжелой цепи и вплоть до 6 суммарных аминокислотных замен внутри указанных областей CDR указанной переменной области легкой цепи, где антитело или его вариант ингибирует зависимую от MASP-2 активацию комплемента. В одном варианте осуществления, ингибирующее MASP-2 средство для использования в способах по изобретению содержит человеческое антитело OMS646.

Таблица 2  
Иллюстративные специфические для MASP-2 антитела

АНТИГЕН	ТИП АНТИТЕЛА	ССЫЛКА
Рекомбинантный MASP-2	Крысиное поликлональное	Peterson, S.V., et al., Mol. Immunol. 37:803 811, 2000
Рекомбинантный человеческий фрагмент CCP1/2 SP (MoAb 8B5)	Крысиное MoAb (подкласс IgG1)	Moller Kristensen, M., et al., J. of Immunol. Methods 282:159 167, 2003
Рекомбинантный человеческий MAP19 (MoAb 6G12) (вступает в перекрестную реакцию с MASP-2)	Крысиное MoAb (подкласс IgG1)	Moller Kristensen, M., et al., J. of Immunol. Methods 282:159 167, 2003
hMASP-2	Мышиное MoAb (S/P) Мышиное MoAb (N-конец)	Peterson, S.V., et al., Mol. Immunol. 35:409, April 1998
hMASP-2 (домен CCP1-CCP2-SP)	крысиное MoAb: Nimoab101, продуцированное линией клеток гибридомы 03050904 (ECACC)	WO 2004/106384
hMASP-2 (полноразмерный, с меткой his)	мышинные MoAb: NimoAb104, продуцированное линией клеток гибридомы M0545YM035 (DSMZ) NimoAb108, продуцированное линией клеток гибридомы M0545YM029 (DSMZ) NimoAb109, продуцированное линией клеток гибридомы M0545YM046 (DSMZ) NimoAb110, продуцированное линией клеток гибридомы M0545YM048 (DSMZ)	WO 2004/106384
Крысиный MASP-2 (полноразмерный)	фрагменты антител Fab2 против MASP-2	Пример 10
hMASP-2 (полноразмерный)	Клоны полностью человеческих scFv	Пример 15 и US2012/0282263

Антитела против MASP-2 с уменьшенной эффекторной функцией.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта изобретения, антитела против MASP-2 имеют уменьшенную эффекторную функцию для уменьшения воспаления, которое может возникать при активации классического пути активации комплемента. Показано, что способность молекул IgG запускать классический путь активации комплемента связана с участком Fc молекулы (Duncan, A.R., et al., Nature 332:738 740 1988). Молекулы IgG, в которых участок Fc удален посредством ферментного расщепления, лишены этой эффекторной функции (см. Harlow, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988). Соответственно, антитела с уменьшенной эффекторной функцией можно получать в результате отсутствия участка Fc молекулы в результате наличия генетически сконструированной последовательности Fc, которая минимизирует эффекторную функцию, или в результате принадлежности к изотипу IgG<sub>2</sub> или IgG<sub>4</sub> человека.

Антитела с уменьшенной эффекторной функцией можно получать посредством стандартных молекулярно-биологических манипуляций с участком Fc тяжелых цепей IgG, как описано в примере 9 в настоящем описании, и также описано в Jolliffe et al., Int'l Rev. Immunol. 10:241 250, 1993, и Rodrigues et al., J. Immunol. 151:6954 6961, 1998. Антитела с уменьшенной эффекторной функцией включают также изотипы IgG<sub>2</sub> и IgG<sub>4</sub> человека, обладающие сниженной способностью активировать комплемент и/или взаимодействовать с рецепторами Fc (Ravetch, J.V., et al., Annu. Rev. Immunol. 9:457 492, 1991; Isaacs, J.D., et al., J. Immunol. 148:3062 3071, 1992; van de Winkel, J.G., et al., Immunol. Today 14:215 221, 1993). Гуманизированные или полностью человеческие антитела, специфические для MASP-2 человека, состоящие из изотипов IgG<sub>2</sub> или IgG<sub>4</sub>, можно получать одним из нескольких способов, известных специалисту в данной области, как описано в Vaughan, T.J., et al., Nature Biotechnol. 16:535 539, 1998.

Получение антител против MASP-2.

Антитела против MASP-2 можно получать с использованием полипептидов MASP-2 (например, полноразмерного MASP-2) или с использованием несущих антигенный эпитоп MASP-2 пептидов (например, части полипептида MASP-2). Иммуногенные пептиды могут являться настолько маленькими,



как пять аминокислотных остатков. Например, полипептид MASP-2, включающий полную аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6, можно использовать для индукции образования антител против MASP-2, которые можно использовать в способе по изобретению. Конкретные домены MASP-2, как известно, вовлеченные в белок-белковые взаимодействия, такие как домены CUBI, и CUBIEGF, так же как область, включающую активный участок сериновой протеазы, можно экспрессировать в форме рекомбинантных полипептидов, как описано в примере 3, и использовать в качестве антигенов. Кроме того, пептиды, содержащие участок из по меньшей мере 6 аминокислот полипептида MASP-2 (SEQ ID NO: 6), также можно использовать для индукции образования антител против MASP-2. Дополнительные примеры происходящих из MASP-2 антигенов, которые можно использовать для индукции образования антител против MASP-2, представлены ниже в табл. 2. Пептиды и полипептиды MASP-2, использованные для индукции образования антител, можно выделять в форме природных полипептидов, или рекомбинантных или синтетических пептидов и каталитически неактивных рекомбинантных полипептидов, таких как MASP-2A, как описано далее в примерах 5-7. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта изобретения, антитела против MASP-2 получают с использованием трансгенной линии мышей, как описано в примерах 8 и 9 и далее описано ниже.

Антигены, который можно использовать для получения антител против MASP-2, включают также слитые полипептиды, такие как MASP-2 или его часть, слитые с полипептидом иммуноглобулина или со связывающим мальтозу белком. Полипептидный иммуноген может представлять собой полноразмерную молекулу или ее часть. Если часть полипептида является подобной гаптену, такая часть может быть преимущественно присоединена или связана с макромолекулярным носителем (таким как гемоцианин морского блюдечка (KLH), бычий сывороточный альбумин (BSA) или токсин столбняка) для иммунизации.

Таблица 3  
Происходящие из MASP-2 антигены

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
SEQ ID NO:6	Человеческий белок MASP-2
SEQ ID NO:51	Мышиный белок MASP-2
SEQ ID NO:8	Домен CUBI человеческого MASP-2 (ак 1-121 из SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:9	Домены CUBIEGF человеческого MASP-2 (ак 1-166 из SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:10	Домены CUBIEGFCUBII человеческого MASP-2 (ак 1-293 из SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:11	Домен EGF человеческого MASP-2 (ак 122-166 из SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:12	Домен сериновой протеазы человеческого MASP-2 (ак 429-671 из SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:13 GKDSCRGDAGGALVFL	Мутантная форма с инактивированным доменом сериновой протеазы (ак 610-625 из SEQ ID NO:6 с мутантным Ser 618)
SEQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL	Человеческий пептид CUBI
SEQ ID NO:15: TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLA TLCCGQ	Человеческий пептид CUBI
SEQ ID NO:16: TFRSDYSN	Участок связывания MBL в человеческом домене CUBI
SEQ ID NO:17: FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFDTGF	Участок связывания MBL в человеческом домене CUBI
SEQ ID NO:18 IDECQVAPG	Пептид EGF
SEQ ID NO:19 ANMLCAGLES GGKDSRGGDSSGALV	Пептид из активного участка сериновой протеазы

#### Поликлональные антитела.

Поликлональные антитела против MASP-2 можно получать посредством иммунизации животных полипептидом MASP-2 или его иммуногенной частью с использованием способов, хорошо известных специалисту в данной области. См., например, Green et al., "Production of Polyclonal Antisera", in *Immunochemical Protocols* (Manson, ed.), page 105. Иммуногенность полипептида MASP-2 можно увеличивать посредством использования адъюванта, включающего минеральные гели, такие как гидроксид алюминия или адъювант Фрейнда (полный или неполный), поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, плурониловые полиолы, полианионы, масляные эмульсии, гемоцианин морского блюдечка и динитрофенол. Образование поликлональных антител, как правило, вызывают у таких животных, как лошади, коровы, собаки, куры, крысы, мыши, кролики, морские свинки, козы или овцы. Альтернативно, антитело против MASP-2, которое можно использовать по настоящему изобретению, можно также получать от человекообразной обезьяны. Общие способы получения диагностически и терапевтически полезных антител у бабуинов можно обнаружить, например, в Goldenberg et al., Международная публикация

патента No. WO 91/11465, и в Losman, M.J., et al., *Int. J. Cancer* 46:310, 1990. Затем сыворотку, содержащую иммунологически активные антитела, получают из крови таких иммунизированных животных с использованием стандартных способов, хорошо известных в данной области.

Моноклональные антитела.

В некоторых вариантах осуществления, ингибирующее MASP-2 средство представляет собой моноклональное антитело против MASP-2. Моноклональные антитела против MASP-2 являются высоко специфическими, будучи направленными против единичного эпитопа MASP-2. В рамках изобретения, определение "моноклональные" указывает на характер антитела, как полученного из по существу гомогенной популяции антител, и не подразумевает необходимость получения антител каким-либо конкретным способом. Моноклональные антитела можно получать с использованием любого способа, который относится к получению молекул антител в культуре стабильных клеточных линий, такого как способ гибридомы, описанный в Kohler, G., et al., *Nature* 256:495, 1975, или их можно получать способами рекомбинантной ДНК (см., например, Патент США No. 4816567 от Cabilly). Моноклональные антитела можно также выделять из фаговых библиотек антител с использованием способов, описанных в Clackson, T., et al., *Nature* 352:624 628, 1991, и Marks, J.D., et al., *J. Mol. Biol.* 222:581 597, 1991. Такие антитела могут принадлежать к любому классу иммуноглобулина, включая IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, и к любому их подклассу.

Например, моноклональные антитела можно получать посредством инъекции подходящему млекопитающему (например, мыши BALB/c) композиции, содержащей полипептид MASP-2 или его часть. После предопределенного периода времени, у мыши выделяют спленоциты и ресуспендируют их в культуральной среде. Затем спленоциты сливают с иммортализованной линией клеток для формирования гибридомы. Сформированные гибридомы выращивают в культуре клеток и подвергают скринингу по их способности продуцировать моноклональные антитела против MASP-2. Примеры, дополнительно описывающие получение моноклональных антител против MASP-2, представлены в настоящем описании (например, примеры 10 и 13) (см. также *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1., John Wiley & Sons, pages 2, 5, 12, 6, 7, 1991).

Человеческие моноклональные антитела можно получать с использованием трансгенных мышей, сконструированных для продукции специфических человеческих антител в ответ на антигенный стимул. По этому способу, элементы локуса тяжелых и легких цепей иммуноглобулина человека вводят в линии мышей, полученные из линий эмбриональных стволовых клеток, содержащих направленные повреждения эндогенных локусов тяжелых и легких цепей иммуноглобулина. Трансгенные мыши могут синтезировать человеческие антитела, специфические для человеческих антигенов, таких как антигены MASP-2, описанные в настоящем описании, и этих мышей можно использовать для получения гибридом, секретирующих человеческие антитела против MASP-2, посредством слияния В-клеток таких животных с подходящими линиями клеток миеломы с использованием общепринятой технологии Келера-Мильштейна, как описано далее в примере 7. Трансгенные мыши с геномом иммуноглобулинов человека являются коммерчески доступными (например, от Abgenix, Inc., Fremont, CA, и Medarex, Inc., Annandale, N.J.). Способы получения человеческих антител от трансгенных мышей описаны, например, в Green, L.L., et al., *Nature Genet.* 7:13, 1994; Lonberg, N., et al., *Nature* 368:856, 1994; и Taylor, L.D., et al., *Int. Immun.* 6:579, 1994.

Моноклональные антитела можно выделять и очищать из культур гибридом посредством множества хорошо разработанных способов. Такие способы выделения включают аффинную хроматографию с использованием сефарозы с белком А, эксклюзионной хроматографии и ионообменной хроматографии (см., например, Coligan at pages 2.7.1-2.7.12 и pages 2.9.1-2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", in *Methods in Molecular Biology*, The Humana Press, Inc., Vol. 10, pages 79 104, 1992).

После получения, поликлональные, моноклональные или полученные с использованием фагов антитела сначала тестируют по специфическому связыванию с MASP-2. Множество анализов, известных специалистам в данной области, можно использовать для детекции антител, специфически связывающихся с MASP-2. Иллюстративные анализы включают анализ вестерн-блоттинга или иммунопреципитации посредством стандартных способов (например, как описано в Ausubel et al.), иммуноэлектрофорез, ферментный иммуносорбентный анализ, дот-блоттинг, анализы ингибирования или конкуренции и сэндвич-анализы (как описано в Harlow and Land, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). После идентификации антител, которые специфически связываются с MASP-2, антитела против MASP-2 тестируют по способности функционировать в качестве ингибирующего MASP-2 средства в одном из нескольких анализов, например, таких как, анализ специфического для лектина расщепления C4 (описанный в примере 2), анализ накопления C3b (описанный в примере 2) или анализ накопления C4b (описанный в примере 2).

Аффинность моноклональных антител против MASP-2 может легко определить специалист в данной области (см., например, Scatchard, A., *NY Acad. Sci.* 51:660 672, 1949). В одном варианте осуществления, моноклональные антитела против MASP-2, которые можно использовать в способах по изобретению, связываются с MASP-2 с аффинностью связывания <100 нМ, предпочтительно, <10 нМ и наиболее предпочтительно, <2 нМ.

Химерные/гуманизированные антитела.

Моноклональные антитела, который можно использовать в способе по изобретению, включают химерные антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретных видов или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время, как остальная часть цепи (цепей) является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных из других видов или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, так же как фрагменты таких антител (патент США No. 4816567, от Cabilly; и Morrison, S.L., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:6851 6855, 1984).

Одной из форм химерного антитела, которое можно использовать по изобретению, является гуманизированное моноклональное антитело против MASP-2. Гуманизированные формы не относящихся к человеку (например, мышиных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, происходящую из не относящегося к человеку иммуноглобулина. Гуманизированные моноклональные антитела получают посредством переноса не относящихся к человеку (например, мышиных) определяющих комплементарности областей (CDR), из тяжелых и легких вариабельных цепей иммуноглобулина мыши в человеческий вариабельный домен. Как правило, затем проводят замены на остатки человеческих антител в каркасных областях не относящихся к человеку эквивалентов. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, не обнаруженные в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации осуществляют для дополнительного уточнения активности антитела. Как правило, гуманизированное антитело содержит в основном все из по меньшей мере одного, и как правило, двух вариабельных доменов, в которых все или в основном все из гипервариабельных петель соответствуют петлям из не относящегося к человеку иммуноглобулина, и все или в основном все из каркасных областей Fv представляют собой области из последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело, необязательно, содержит также по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, из человеческого иммуноглобулина. Дополнительные подробности, см. в Jones, P.T., et al., Nature 321:522 525, 1986; Reichmann, L., et al., Nature 332:323 329, 1988; и Presta, Curt. Op. Struct. Biol. 2:593 596, 1992.

Гуманизированные антитела, которые можно использовать по изобретению, включают человеческие моноклональные антитела, содержащие по меньшей мере связывающую MASP-2 область CDR3. Кроме того, части Fc можно заменять таким образом, чтобы получать IgA или IgM, так же как человеческие антитела IgG. Такие гуманизированные антитела могут иметь особенную клиническую полезность, поскольку они специфически узнают MASP-2 человека, но не провоцируют иммунный ответ у человека против самого антитела. Следовательно, они лучше подходят для введения человеку *in vivo*, особенно, когда необходимо повторяющееся или долгосрочное введение.

Пример получения гуманизированного антитела против MASP-2 из мышинового моноклонального антитела против MASP-2 представлен в настоящем описании в примере 6. Способы получения гуманизированных моноклональных антител описаны также, например, в Jones, P.T., et al., Nature 321:522, 1986; Carter, P., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:4285, 1992; Sandhu, J.S., Crit. Rev. Biotech. 12:437, 1992; Singer, I.I., et al., J. Immun. 150:2844, 1993; Sudhir (ed.), Antibody Engineering Protocols, Humana Press, Inc., 1995; Kelley, "Engineering Therapeutic Антитела", in Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., pages 399 434, 1996; и в Патенте США No. 5693762, от Queen, 1997. Кроме того, существуют коммерческие организации, которые синтезируют гуманизированные антитела из специфических областей мышинового антитела, такие как Protein Design Labs (Mountain View, CA).

Рекомбинантные антитела.

Антитела против MASP-2 можно также получать с использованием рекомбинантных способов. Например, человеческие антитела можно получать с использованием экспрессирующих человеческие иммуноглобулины библиотек (доступных, например, из Stratagene, Corp., La Jolla, CA) для получения фрагментов человеческих антител (V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>, Fv, Fd, Fab или F(ab')<sub>2</sub>). Эти фрагменты затем используют для конструирования полностью человеческих антител с использованием способов, сходных со способами получения химерных антител.

Антиидиотипические антитела.

После идентификации антител против MASP-2 с желательной ингибирующей активностью, эти антитела можно использовать для получения антиидиотипических антител, напоминающих часть MASP-2, с использованием способов, хорошо известных в данной области. См., например, Greenspan, N.S., et al., FASEB J. 7:437, 1993. Например, антитела, которые связываются с MASP-2 и конкурентно ингибируют белковые взаимодействия MASP-2, необходимые для активации комплемента, можно использовать для получения антиидиотипических антител, которые напоминают участок связывания MBL на белке MASP-2 и таким образом, связывают и нейтрализуют связывающий лиганд MASP-2 например, такой как MBL.

Фрагменты иммуноглобулинов.

Ингибирующие MASP-2 средства, которые можно использовать в способе по изобретению, включают не только интактные молекулы иммуноглобулинов, но также хорошо известные фрагменты, включая фрагменты Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub> и Fv, фрагменты scFv, диатела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифические антитела, сформированные из фрагментов антител.

В данной области хорошо известно, что только небольшая область молекулы антитела, паратоп, вовлечена в связывание антитела с его эпитопом (см., например, Clark, W.R., *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc., NY, 1986). Области pFc' и Fc антитела являются эффекторами классического пути активации комплемента, но не вовлечены в связывание антигена. Антитело, из которого при помощи ферментов вырезана область pFc', или которое получено без области pFc', обозначено как фрагмент F(ab')<sub>2</sub> и сохраняет оба антигенсвязывающих участка интактного антитела. Выделенный фрагмент F(ab')<sub>2</sub> относится к бивалентному моноклональному фрагменту из-за его двух антигенсвязывающих участков. Подобным образом, антитело, из которого при помощи ферментов вырезана область Fc, или которое получено без области Fc, обозначено как фрагмент Fab, и сохраняет один из антигенсвязывающих участков интактной молекулы антитела.

Фрагменты антител можно получать посредством протеолитического гидролиза, такого как расщепление полноразмерных антител пепсином или папаином посредством общепринятых способов. Например, фрагменты антител можно получать посредством ферментного расщепления антител с использованием пепсина для получения 5S фрагмента, обозначенного F(ab')<sub>2</sub>. Этот фрагмент можно далее расщеплять с использованием восстанавливающего тиол средства для получения 3,5S моновалентных фрагментов Fab'. Необязательно, реакцию расщепления можно проводить с использованием блокирующей группы для сульфгидрильных групп, которые образуются в результате расщепления дисульфидных связей. В качестве альтернативы, ферментное расщепление с использованием пепсина напрямую образует два моновалентных фрагмента Fab и фрагмент Fc. Эти способы описаны, например, в Патенте США No. 4331647 от Goldenberg; Nisonoff, A., et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230, 1960; Porter, R.R., *Biochem. J.* 73:119, 1959; Edelman, et al., in *Methods in Enzymology* 1:422, Academic Press, 1967; и в Coligan at pages 2.8.1-2.8.10 and 2.10. 2.10.4.

В некоторых вариантах осуществления, использование фрагментов антител с отсутствием области Fc является предпочтительным для избегания активации классического пути активации комплемента, которая инициируется посредством связывания Fc с рецептором Fcγ. Существует несколько способов, посредством которых можно получать MoAb, которые исключают взаимодействия рецептора Fcγ. Например, область Fc моноклонального антитела можно удалять химически с использованием частичного расщепления протеолитическими ферментами (такого как расщепление фицином), с получением таким образом, например, антигенсвязывающих фрагментов антител, таких как фрагменты Fab или F(ab)<sub>2</sub> (Mariani, M., et al., *Mol. Immunol.* 28:69 71, 1991). Альтернативно, изотип γ4 IgG человека, не связывающий рецепторы Fcγ, можно использовать в конструировании гуманизированного антитела, как описано в настоящем описании. Антитела, одноцепочечные антитела и антигенсвязывающие домены, лишённые домена Fc, также можно получать с использованием рекомбинантных способов, описанных в настоящем описании.

Одноцепочечные фрагменты антител.

Альтернативно, можно получать связывающие молекулы с единичной полипептидной цепью, специфические для MASP-2, в которых области Fv тяжелой и легкой цепи соединены. Фрагменты Fv можно соединять посредством пептидного линкера для формирования одноцепочечного антигенсвязывающего белка (scFv). Эти одноцепочечные антигенсвязывающие белки получают посредством конструирования структурного гена, содержащего последовательности ДНК, кодирующие домены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, соединённые посредством олигонуклеотида. Структурный ген вставляют в экспрессирующий вектор, который затем вводят в клетку-хозяина, такую как *E. coli*. Рекомбинантные клетки-хозяева синтезируют одиночную полипептидную цепь с пептидным линкером, соединяющим два домена V. Способы получения scFv описаны, например, by Whitlow, et al., "Methods: A Companion to Methods in Enzymology" 2:97, 1991; Bird, et al., *Science* 242:423, 1988; патент США No. 4946778, to Ladner; Pack, P., et al., *Bio/Technology* 11:1271, 1993.

В качестве иллюстративного примера, специфический для MASP-2 scFv можно получать посредством подвергания лимфоцитов воздействию полипептида MASP-2 *in vitro* и отбора из библиотек дисплея антител в фаговых или сходных векторов (например, посредством использования иммобилизованных или меченых белков или пептидов MASP-2). Гены, кодирующие полипептиды, имеющие потенциальные связывающие полипептид MASP-2 домены, можно получать посредством скрининга библиотек случайных пептидов, экспонированных на фаге или на бактериях, таких как *E. coli*. Эти библиотеки дисплея случайных пептидов можно использовать для скрининга пептидов, которые взаимодействуют с MASP-2. Способы получения и скрининга таких библиотек дисплея случайных пептидов хорошо известны в данной области (патент США No. 5223409, от Lardner; патент США No. 4946778, от Ladner; патент США No. 5403484, от Lardner; патент США No. 5571698, от Lardner; и Kay et al., *Phage Display of Peptides and Proteins* Academic Press, Inc., 1996) и библиотеки дисплея случайных пептидов и наборы для скрининга таких библиотек являются коммерчески доступными, например, из CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif.), Invitrogen Inc. (San Diego, Calif.), New England Biolabs, Inc. (Beverly, Mass.), и Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, N.J.).

Другой формой фрагмента антитела против MASP-2, который можно использовать в этом аспекте изобретения, является пептид, кодирующий одиночную определяющую комплементарность область

(CDR), которая связывается с эпитопом на антигене MASP-2 и ингибирует зависимую от MASP-2 активацию комплемента. Пептиды CDR ("минимальные узнающие единицы") можно получать посредством конструирования генов, кодирующих CDR представляющего интерес антитела. Такие гены получают, например, с использованием полимеразной цепной реакции для синтеза варибельной области по РНК из продуцирующих антитела клеток (см., например, Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106, 1991; Courtenay Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), page 166, Cambridge University Press, 1995; и Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al. (eds.), page 137, Wiley Liss, Inc., 1995).

Антитела против MASP-2, описанные в настоящем описании, вводят пациенту для ингибирования зависимой от MASP-2 активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления, ингибирующее MASP-2 средство представляет собой высокоаффинное человеческое или гуманизованное моноклональное антитело против MASP-2 с уменьшенной эффекторной функцией.

Пептидные ингибиторы.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта изобретения, ингибирующее MASP-2 средство содержит выделенные пептидные ингибиторы MASP-2, включая выделенные природные пептидные ингибиторы и синтетические пептидные ингибиторы, которые ингибируют систему зависимой от MASP-2 активации комплемента. В рамках изобретения, термин "выделенные пептидные ингибиторы MASP-2" относится к пептидам, которые ингибируют зависимую от MASP-2 активацию комплемента посредством связывания, конкурирующего с MASP-2 за связывание, с другой узнающей молекулой (например, MBL, Н-фиколином, М-фиколином или L-фиколином) в лектиновом пути, и/или непосредственного взаимодействия с MASP-2 для ингибирования зависимой от MASP-2 активации комплемента, которые являются в основном чистыми и являются в основном свободными от других веществ, вместе с которыми их можно обнаружить в природе, до степени, практически осуществимой и подходящей для предназначенного для них применения.

Пептидные ингибиторы успешно использовали *in vivo* для создания помех для белок-белковых взаимодействий и каталитических участков. Например, пептидные ингибиторы молекул адгезии, структурно родственные LFA-1, недавно одобрены для клинического использования при коагулопатиях (Ohman, E.M., et al., *European Heart J.* 16:50 55, 1995). Описаны короткие линейные пептиды (<30 аминокислот), которые предотвращают зависимую от интегринов адгезию или создают для нее помехи (Murayama, O., et al., *J. Biochem.* 120:445 51, 1996). Более длинные пептиды, с длиной в диапазоне от 25 до 200 аминокислотных остатков, также успешно использовали для блокирования зависимой от интегринов адгезии (Zhang, L., et al., *J. Biol. Chem.* 271(47):29953 57, 1996). Как правило, более длинные пептидные ингибиторы имеют более высокую аффинность и/или более низкие скорости диссоциации, чем короткие пептиды, и могут, таким образом, являться более сильными ингибиторами. Показано также, что циклические пептидные ингибиторы являются эффективными ингибиторами интегринов *in vivo* для лечения воспалительных заболеваний человека (Jackson, D.Y., et al., *J. Med. Chem.* 40:3359 68, 1997). Один из способов получения циклических пептидов включает синтез пептидов, в котором концевые аминокислоты пептида представляют собой цистеины, таким образом, позволяя пептиду существовать в циклической форме посредством дисульфидной связи между концевыми аминокислотами, для которой показано улучшение аффинности и времени полужизни *in vivo* для лечения гематопоэтических неоплазий (например, патент США No. 6649592, от Larson).

Синтетические пептидные ингибиторы MASP-2.

Ингибирующие MASP-2 пептиды, которые можно использовать в способах по этому аспекту изобретения, проиллюстрированы аминокислотными последовательностями, которые имитируют участки-мишени, важные для функции MASP-2. Ингибирующие пептиды, которые можно использовать в практическом осуществлении способов по изобретению, имеют размер в диапазоне от приблизительно 5 аминокислоты до приблизительно 300 аминокислот. В табл. 4 представлен список иллюстративных ингибирующих пептидов, которые можно использовать в практическом осуществлении этого аспекта настоящего изобретения. Ингибирующий MASP-2 пептид-кандидат можно тестировать по способности функционировать в качестве ингибирующего MASP-2 средства в одном из нескольких анализов, включая, например, анализ специфического для лектина расщепления C4 (описан в примере 2) и анализ накопления C3b (описан в примере 2).

В некоторых вариантах осуществления, ингибирующие MASP-2 пептиды происходят из полипептидов MASP-2 и выбраны из полноразмерного зрелого белка MASP-2 (SEQ ID NO: 6), или из конкретного домена белка MASP-2, например, такого как домен CUBI (SEQ ID NO: 8), домен CUBIEGF (SEQ ID NO: 9), домен EGF (SEQ ID NO: 11) и домен сериновой протеазы (SEQ ID NO: 12). Как описано ранее, показано, что области CUBIEGFCUBII являются необходимыми для димеризации и связывания с MBL (Thielens et al., выше). В частности, показано, что пептидная последовательность TFRSDYN (SEQ ID NO: 16) в домене CUBI MASP-2 вовлечена в связывание MBL, в исследовании, в котором идентифицировано наличие у человека гомозиготной мутации Asp105 до Gly105, приводящей к потере MASP-2 из комплекса MBL (Stengaard Pedersen, K., et al., *New England J. Med.* 349:554 560, 2003).

В некоторых вариантах осуществления, ингибирующие MASP-2 пептиды происходят из лектиновых белков, которые связываются с MASP-2 и вовлечены в лектиновый путь комплемента. Идентифицировано несколько различных лектинов, вовлеченных в этот путь, включая связывающий маннан лектин (MBL), L-фиколин, M-фиколин и H-фиколин. (Ikeda, K., et al., *J. Biol. Chem.* 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M., et al., *J. Exp. Med.* 176:1497-2284, 2000; Matsushita, M., et al., *J. Immunol.* 168:3502-3506, 2002). Эти лектины присутствуют в сыворотке в форме олигомеров гомотримерных субъединиц, каждая из которых имеет N-концевые подобные коллагену волокна с узнающими углеводы доменами. Показано, что эти различные лектины связываются с MASP-2, и комплекс лектин/MASP-2 активирует комплемент посредством расщепления белков C4 и C2. H-фиколин имеет аминоконцевую область из 24 аминокислот, подобный коллагену домен с 11 повторами Gly-Xaa-Yaa, шеечный домен из 12 аминокислот и подобный фибриногену домен из 207 аминокислот (Matsushita, M., et al., *J. Immunol.* 168:3502-3506, 2002). H-фиколин связывается с GlcNAc и вызывает агглютинацию человеческих эритроцитов, покрытых LPS, происходящими из *S. typhimurium*, *S. minnesota* и *E. coli*. Показано, что H-фиколин ассоциирован с MASP-2 и MAp19 и активирует лектиновый путь. Вышеупомянутый L-фиколин/P35 также связывается с GlcNAc и показано, что он ассоциирован с MASP-2 и MAp19 в сыворотке человека, и показано, что этот комплекс активирует лектиновый путь (Matsushita, M., et al., *J. Immunol.* 164:2281, 2000). Соответственно, ингибирующие MASP-2 пептиды, которые можно использовать по настоящему изобретению, могут содержать область по меньшей мере из 5 аминокислот, выбранных из белка MBL (SEQ ID NO: 21), белка H-фиколина (номер доступа в Genbank NM\_173452), белка M-фиколина (номер доступа в Genbank O00602) и белка L-фиколина (номер доступа в Genbank NM\_015838).

Более конкретно, ученые идентифицировали участок связывания MASP-2 на MBL, находящийся внутри 12 триплетов Gly-X-Y "GKD-GRD-GTK-GEK-GEP-GQG-LRG-LQG-POG-KLG-POG-NOG-PSG-SOG-PKG-QKG-DOG-KS" (SEQ ID NO: 26), которые расположены между шарнирным и шеечным участками в C-концевой части подобного коллагену домена MBP (Wallis, R., et al., *J. Biol. Chem.* 279:14065, 2004). Эта область участка связывания MASP-2 является также высоко консервативной в H-фиколине человека и L-фиколине человека. Описан консенсусный участок связывания, который присутствует во всех трех лектиновых белках, содержащий аминокислотную последовательность "OGK-X-GP" (SEQ ID NO: 22), где буквой "O" представлен гидроксипролин, и буквой "X" представлен гидрофобный остаток (Wallis et al., 2004, выше). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, ингибирующие MASP-2 пептиды, которые можно использовать в этом аспекте изобретения, имеют длину по меньшей мере 6 аминокислот и содержат SEQ ID NO: 22. Показано, что пептиды, происходящие из MBL, которые включают аминокислотную последовательность "GLR-GLQ-GPO-GKL-GPO-G" (SEQ ID NO: 24) связывают MASP-2 *in vitro* (Wallis, et al., 2004, выше). Для усиления связывания с MASP-2, можно синтезировать пептиды, фланкированные двумя триплетами GPO на каждом из концов ("GPO-GPO-GLR-GLQ-GPO-GKL-GPO-GGP-OGP-O" SEQ ID NO: 25), для улучшения формирования тройных спиралей в нативном белке MBL (как дополнительно описано в Wallis, R., et al., *J. Biol. Chem.* 279:14065, 2004).

Из H-фиколина человека можно также получать ингибирующие MASP-2 пептиды, включающие последовательность "GAO-GSO-GEK-GAO-GPQ-GPO-GPO-GKM-GPK-GEO-GDO" (SEQ ID NO: 27) из консенсусной области связывания MASP-2 в H-фиколине. Включены также пептиды, полученные из L-фиколина человека, включающие последовательность "GCO-GLO-GAO-GDK-GEA-GTN-GKR-GER-GPO-GPO-GKA-GPO-GPN-GAO-GEO" (SEQ ID NO: 28) из консенсусной области связывания MASP-2 в L-фиколине.

Ингибирующие MASP-2 пептиды можно также получать из участка расщепления C4, такого как "LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI" (SEQ ID NO: 29), который представляет собой участок расщепления C4, связанный с C-концевой частью антитромбина III (Glover, G.I., et al., *Mol. Immunol.* 25:1261 (1988)).

Таблица 4  
Иллюстративные ингибирующие MASP-2 пептиды

SEQ ID NO	Источник
SEQ ID NO:6	Человеческий белок MASP-2
SEQ ID NO:8	Домен CUBI MASP-2 (ак 1-121 из SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:9	Домены CUBIEGF MASP-2 (ак 1-166 из SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:10	Домены CUBIEGFCUBII MASP-2 (ак 1-293 из SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:11	Домен EGF MASP-2 (ак 122 166)
SEQ ID NO:12	Домен сериновой протеазы MASP-2 (ак 429 671)
SEQ ID NO:16	Участок связывания MBL в MASP-2
SEQ ID NO:3	Человеческий MAP19
SEQ ID NO:21	Человеческий белок MBL
SEQ ID NO:22 OGK X GP, где «O»=гидроксипролин и «X» представляет собой гидрофобный аминокислотный остаток	Синтетический пептид, консенсусный участок связывания MBL человека и фиколинов человека
SEQ ID NO:23 OGKLG	Кор участка связывания MBL человека
SEQ ID NO:24 GLR GLQ GPO GKL GPO G	Человеческий MBP, триплеты 6-10, для которых показано связывание MASP-2
SEQ ID NO:25 GPOGPOGLRGLQGPOGKLGPOGGPOGPO	Триплеты человеческого MBP с GPO, добавленным для улучшения формирования тройных спиралей
SEQ ID NO:26 GKDGRDGTKGEKGEFGQLRGLQGPOGKLGPOGNOGPGSGOGPKGQKGDGKGS	Триплеты 1-17 человеческого MBP
SEQ ID NO:27 GAOGSOGKGAOGPQGGPOGPOGKMGPK GEOGDO	Фиколин H человека (Hataka)
SEQ ID NO:28 GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPO GPOGKAGPOGPNGAOGEO	Фиколин L человека P35
SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI	Участок расщепления C4 человека

Примечание: буквой "O" представлен гидроксипролин. Буквой "X" представлен гидрофобный остаток.

Пептиды, полученные из участка расщепления C4, так же как другие пептиды, ингибирующие участок сериновой протеазы MASP-2, можно химически модифицировать таким образом, что они становятся необратимыми ингибиторами протеаз. Например, соответствующие модификации могут включать, но без обязательного ограничения, галометилкетоны (Br, Cl, I, F) на C-конце, Asp или Glu, или присоединенные к функциональным боковым цепям; группы галоацетила (или другого  $\alpha$ -галоацетила) на аминогруппах или других функциональных боковых цепях; содержащие эпоксид или имин группы на амино- или карбокси-концах или на функциональных боковых цепях; или сложные эфиры имидата на амино- или карбокси-концах или на функциональных боковых цепях. Такие модификации предоставляют преимущество постоянного ингибирования фермента посредством ковалентного присоединения пептида. Это может приводить к более низким эффективным дозам и/или к необходимости менее частого введения пептидного ингибитора.

В дополнение к ингибирующим пептидам, описанным выше, ингибирующие MASP-2 пептиды, которые можно использовать в способе по изобретению, включают пептиды, содержащие связывающую MASP-2 область CDR3 MoAb против MASP-2, полученного, как описано в настоящем описании. Последовательность областей CDR для использования в синтезе пептидов можно определять способами, известными в данной области. Варибельная область тяжелой цепи представляет собой пептид, длина которого обычно лежит в диапазоне от 100 до 150 аминокислот. Варибельная область легкой цепи представляет собой пептид, длина которого обычно лежит в диапазоне от 80 до 130 аминокислот. Последова-

тельности CDR внутри переменных областей тяжелой и легкой цепей включают только последовательности из приблизительно 3-25 аминокислот, которые может легко секвенировать специалист в данной области.

Специалисту в данной области известно, что в основном гомологичные варианты ингибирующих MASP-2 пептидов, описанных выше, также имеют активность ингибирования MASP-2.

Иллюстративные варианты включают, но без обязательного ограничения, пептиды, имеющие вставки, делеции, замены и/или добавления аминокислот в карбокси-концевых или амино-концевых областях рассматриваемых пептидов и их смеси. Соответственно, считают, что эти гомологичные пептиды, имеющие активность ингибирования MASP-2, можно использовать в способах по этому изобретению. Описанные пептиды могут также включать дублированные мотивы и другие модификации с консервативными заменами. Консервативные варианты описаны в другом месте настоящего описания, и включают замену одной аминокислоты на другую с подобным зарядом, размером или гидрофобностью и т.п.

Ингибирующие MASP-2 пептиды можно модифицировать для увеличения растворимости и/или для максимизации положительного или отрицательного заряда для того, чтобы они более близко напоминали фрагмент интактного белка. Производное может иметь или может не иметь точную первичную аминокислотную структуру пептида, описанного в настоящем описании, при условии, что производное функционально сохраняет желательное свойство ингибирования MASP-2. Модификации могут включать замену аминокислоты на одну из общеизвестных двадцати аминокислот или на другую аминокислоту, на дериватизированную или замещенную аминокислоту с дополнительными желательными характеристиками, такими как устойчивость к ферментной деградации, или на D-аминокислоту, или замену на другую молекулу или соединение, такую как углевод, которая имитирует природную конформацию и функцию аминокислоты, аминокислот или пептида; делецию аминокислоты; вставку аминокислоты из одной из общеизвестных двадцати аминокислот или другой аминокислоты, дериватизированной или замещенной аминокислоты с дополнительными желательными характеристиками, такими как устойчивость к ферментной деградации, или D-аминокислоты, или с замещением другой молекулой или соединением, такой как углевод, которая имитирует природную конформацию и функцию аминокислоты, аминокислот или пептида; или замещение другой молекулой или соединением, такими как углевод или мономер нуклеиновой кислоты, которые имитируют природную конформацию, распределение заряда и функцию исходного пептида. Пептиды можно также модифицировать посредством ацетилирования или амидирования.

Синтез производных ингибирующих пептидов может быть основан на известных способах биосинтеза пептидов, биосинтеза углеводов и т.п. В качестве исходной точки, специалист в данной области может полагаться на подходящую компьютерную программу для определения конформации представляющего интерес пептида. После определения конформации пептида, описанного в настоящем описании, специалист в данной области может определить способ рационального дизайна, сортирующий замены, которые можно осуществлять в одном или нескольких участках для получения производного, которое сохраняет основную конформацию и распределение зарядов исходного пептида, но которое может иметь характеристики, которые у него отсутствуют, или которое усиливает характеристики, обнаруженные в исходном пептиде. После идентификации производных-кандидатов молекул, производные можно тестировать для определения того, функционируют ли они в качестве ингибирующих MASP-2 средств, с использованием анализов, описанных в настоящем описании.

Скрининг ингибирующих MASP-2 пептидов.

Можно также использовать молекулярное моделирование и рациональный молекулярный дизайн для получения и скрининга пептидов, которые имитируют молекулярные структуры ключевых областей связывания MASP-2 и ингибируют активность MASP-2 применительно к комплементу. Молекулярные структуры, используемые для моделирования, включают области CDR моноклональных антител против MASP-2, так же как области-мишени, как известно, важные для функции MASP-2, включая область, необходимую для димеризации, область, вовлеченную в связывание с MBL, и активный участок сериновой протеазы, как описано ранее. Способы идентификации пептидов, связывающих конкретную мишень, хорошо известны в данной области. Например, молекулярный импринтинг можно использовать для конструирования *de novo* макромолекулярных структур, таких как пептиды, связывающиеся с конкретной молекулой. См., например, Shea, K.J., "Molecular Imprinting of Synthetic Network Polymers: The De Novo synthesis of Macromolecular Binding and Catalytic Sites", TRIP 2(5) 1994.

В качестве иллюстративного примера, один из способов получения миметиков связывающих MASP-2 пептидов является следующим. Функциональные мономеры известного связывающего MASP-2 пептида или связывающей области антитела против MASP-2, для которых показано ингибирование MASP-2 (матрицу) подвергают полимеризации. Затем матрицу удаляют, с последующей полимеризацией второго класса мономеров в пространстве, оставленном матрицей, для получения новой молекулы, имеющей одно или несколько желательных свойств, сходных со свойствами матрицы. В дополнение к получению пептидов этим способом, можно получать также связывающие MASP-2 молекулы, представляющие собой ингибирующие MASP-2 средства, такие как полисахариды, нуклеозиды, лекарственные средства, нуклеопротеины, липопротеины, углеводы, гликопротеины, стероиды, липиды и другие биологически активные материалы. Этот способ можно использовать для разработки широкого множества биоло-



гических миметиков, которые являются более стабильными, чем их природные эквиваленты, поскольку их, как правило, получают посредством полимеризации функциональных мономеров с использованием свободных радикалов, получая в результате соединение с небiorазлагаемым остовом.

Синтез пептидов.

Ингибирующие MASP-2 пептиды можно получать с использованием способов, хорошо известных в данной области, таких как способ твердофазного синтеза, первоначально описанный в Merrifield, in *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-2154, 1963. Автоматизированный синтез можно осуществлять, например, с использованием синтезатора пептидов Applied Biosystems 431A (Foster City, Calif.), в соответствии с инструкциями производителя. Другие способы можно обнаружить, например, в Bodanszky, M., et al., *Pepptide Synthesis*, second edition, John Wiley & Sons, 1976, так же как в ссылках на другие работы, известные специалистам в данной области.

Пептиды можно также получать с использованием стандартных способов генной инженерии, известных специалистам в данной области. Например, пептид можно получать ферментным способом, посредством вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид, в экспрессирующий вектор, экспрессирующий ДНК, и трансляции ДНК в пептид в присутствии необходимых аминокислот. Затем пептид очищают с использованием хроматографических или электрофоретических способов, или посредством белка-носителя, который можно сливать с этим пептидом и впоследствии отщеплять от него, посредством вставки в экспрессирующий вектор, с совпадением по фазе с кодирующей пептид последовательностью, последовательности нуклеиновой кислоты кодирующей белок-носитель. Слитый с пептидом белок можно выделять с использованием хроматографических, электрофоретических или иммунологических способов (таких как связывание со смолой посредством антитела против белка-носителя). Пептид можно расщеплять с использованием химических способов или ферментативно, например, посредством гидролаз.

Ингибирующие MASP-2 пептиды, которые можно использовать в способе по изобретению, можно также получать в рекомбинантных клетках-хозяевах, следуя общепринятым способам. Для экспрессии последовательностей, кодирующих ингибирующие MASP-2 пептиды, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая пептид, должна быть функционально связана с регуляторными последовательностями, контролирующими экспрессию на уровне транскрипции в экспрессирующем векторе, и затем введена в клетку-хозяина. В дополнение к регулирующим транскрипцию последовательностям, таким как промоторы и энхансеры, экспрессирующие векторы могут включать регулирующие трансляцию последовательности и маркерный ген, пригодные для отбора клеток, несущих экспрессирующий вектор.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие ингибирующий MASP-2 пептид, можно синтезировать с использованием "генных машин" с использованием таких способов, как фосфорамидитный способ. Если химически синтезированная двухцепочечная ДНК необходима для такого применения, как синтез гена или фрагмента гена, тогда каждую комплементарную цепь получают отдельно. Получение коротких генов (60-80 пар оснований) не вызывает технических затруднений, и его можно осуществлять посредством синтеза комплементарных цепей и затем их гибридизации. Для получения более длинных генов, синтетические гены (двухцепочечные) собирают в модульную форму из одноцепочечных фрагментов длиной 20-100 нуклеотидов. Обзор синтеза полинуклеотидов, см., например, в Glick and Pasternak, "Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA", ASM Press, 1994; Itakura, K., et al., *Annu. Rev. Biochem.* 53:323, 1984; и Climie, S., et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 87:633, 1990.

Низкомолекулярные ингибиторы.

В некоторых вариантах осуществления, ингибирующие MASP-2 средства представляют собой низкомолекулярные ингибиторы, включая природные и синтетические вещества, имеющие низкую молекулярную массу, например, такие как пептиды, пептидомиметики и непептидные ингибиторы (включая олигонуклеотиды и органические соединения). Низкомолекулярные ингибиторы MASP-2 можно получать на основе молекулярной структуры переменных областей антител против MASP-2.

Низкомолекулярные ингибиторы можно также разрабатывать и получать на основе кристаллической структуры MASP-2 с использованием компьютерного дизайна лекарственных средств (Kuntz I.D., et al., *Science* 257:1078, 1992). Описана кристаллическая структура крысиного MASP-2 (Feinberg, H., et al., *EMBO J.* 22:2348-2359, 2003). С использованием способа, описанного в Kuntz et al., координаты кристаллической структуры MASP-2 используют в качестве входных данных для компьютерной программы, такой как DOCK, которая на выходе выдает список низкомолекулярных структур с ожидаемой способностью связывания с MASP-2. Использование таких компьютерных программ хорошо известно специалисту в данной области. Например, кристаллическую структуру ингибитора протеазы HIV-1 использовали для идентификации уникальных непептидных лигандов, которые являются ингибиторами протеазы HIV-1, посредством оценки совместимости соединений, обнаруженных в базе данных Cambridge Crystallographic, с участком связывания фермента с использованием программы DOCK (Kuntz, I.D., et al., *J. Mol. Biol.* 161:269-288, 1982; DesJarlais, R.L., et al., *PNAS* 87:6644-6648, 1990).

Список низкомолекулярных структур, идентификация которых компьютерным способом в качестве потенциальных ингибиторов MASP-2, подвергали скринингу с использованием анализа связывания MASP-2, как описано в примере 10. Затем малые молекулы, как обнаружено, связывающие MASP-2, ана-

лизировали в функциональном анализе, таком, как описано в примере 2, для определения того, ингибируют ли они зависимость от MASP-2 активацию комплемента.

Растворимые рецепторы MASP-2.

Считают, что другие подходящие ингибирующие MASP-2 средства включают растворимые рецепторы MASP-2, которые можно получать с использованием способов, известных специалисту в данной области.

Ингибиторы экспрессии MASP-2.

В другом варианте осуществления этого аспекта изобретения, ингибирующее MASP-2 средство представляет собой ингибитор экспрессии MASP-2, способный ингибировать зависимость от MASP-2 активацию комплемента. В практическом осуществлении этого аспекта изобретения, репрезентативные ингибиторы экспрессии MASP-2 экспрессии включают молекулы антисмысловой нуклеиновой кислоты MASP-2 (такие как антисмысловая мРНК, антисмысловая ДНК или антисмысловые олигонуклеотиды), рибозимы MASP-2 и молекулы РНКи MASP-2.

Антисмысловые молекулы РНК и ДНК действуют для непосредственного блокирования трансляции мРНК MASP-2 посредством гибридизации с мРНК MASP-2 и предотвращения трансляции белка MASP-2. Антисмысловую молекулу нуклеиновой кислоты можно конструировать посредством ряда различных способов, при условии, что она является способной препятствовать экспрессии MASP-2. Например, антисмысловую молекулу нуклеиновой кислоты можно конструировать посредством инвертирования кодирующей области (или ее части) кДНК MASP-2 (SEQ ID NO: 4) относительно его нормальной ориентации для транскрипции, что позволяет осуществить транскрипцию ее комплемента.

Обычно антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты является по существу идентичной по меньшей мере части гена или генов-мишеней. Однако нуклеиновая кислота, не обязательно должна быть абсолютно идентичной для ингибирования экспрессии. Как правило, более высокую гомологию можно использовать для компенсации использования более короткой антисмысловой молекулы нуклеиновой кислоты. Минимальный процент идентичности, как правило, составляет более приблизительно 65%, однако более высокий процент идентичности может оказывать более эффективную репрессию экспрессии эндогенной последовательности. По существу, более высокий процент идентичности более чем приблизительно 80%, как правило, является предпочтительным, хотя значения от приблизительно 95% до полной идентичности, как правило, являются наиболее предпочтительными.

Антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты не обязательно должна иметь такой же интронный или экзонный паттерн, как ген-мишень, и некодирующие фрагменты гена-мишени могут являться равным образом эффективными в достижении антисмысловой супрессии экспрессии гена-мишени, как и кодирующие фрагменты. Последовательность ДНК из по меньшей мере приблизительно 8 или подобного количества нуклеотидов можно использовать в качестве антисмысловой молекулы нуклеиновой кислоты, хотя более длинная последовательность является предпочтительной. По настоящему изобретению, репрезентативным примером ингибирующего MASP-2 средства, которое можно использовать, является антисмысловая молекула нуклеиновой кислоты MASP-2, которая является по меньшей мере на девятнадцать процентов идентичной последовательности, комплементарной кДНК MASP-2, состоящей из последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 4. Последовательность нуклеиновой кислоты, представленная в SEQ ID NO: 4, кодирует белок MASP-2, состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5.

Нацеливание антисмысловых олигонуклеотидов на связывание с мРНК MASP-2 представляет собой другой механизм, который можно использовать для уменьшения уровня синтеза белка MASP-2. Например, синтез полигалактуроназы и мускаринового рецептора ацетилхолина типа 2 ингибируют посредством антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на соответствующие им последовательности мРНК (патент США No. 5739119, от Cheng, и Патент США No. 5759829, от Shewmaker). Кроме того, показаны примеры антисмыслового ингибирования для ядерного белка циклина, гена множественной лекарственной устойчивости (MDG1), ICAM-1, селектина Е, STK-1, стриарного рецептора GABA<sub>A</sub> и EGF человека (см., например, Патент США No. 5801154, от Baracchini; патент США No. 5789573, от Baker; патент США No. 5718709, от Considine; и Патент США No. 5610288, от Reubenstein).

Описана система, позволяющая специалисту в данной области определять, какие олигонуклеотиды можно использовать по изобретению, включающая анализ с использованием зондов подходящих участков в мРНК-мишени с использованием расщепления РНКазой H в качестве показателя доступности последовательностей внутри транскриптов. Scherr, M., et al., *Nucleic Acids Res.* 26:5079-5085, 1998; Lloyd, et al., *Nucleic Acids Res.* 29:3665-3673, 2001. Смесь антисмысловых олигонуклеотидов, являющихся комплементарными конкретным областям транскрипта MASP-2, добавляют к экстрактам клеток, экспрессирующих MASP-2, таких как гепатоциты, и гибридизуют для получения участка, чувствительного к РНКазе H. Этот способ можно комбинировать с компьютеризированным отбором последовательностей, который может прогнозировать оптимальный отбор последовательностей для антисмысловых композиций, на основании их относительной способности формировать димеры, шпильки или другие вторичные структуры, которые препятствуют специфическому связыванию с мРНК-мишенью в клетке-хозяине. Эти анализы вторичной структуры и отбор участка-мишени можно осуществлять с использованием программ-

ного обеспечения для анализа праймеров OLIGO (Rychlik, I., 1997) и компьютерного алгоритма BLASTN 2.0.5 (Altschul, S.F., et al., Nucl. Acids Res. 25:3389-3402, 1997). Антисмысловые соединения, нацеленные на последовательность-мишень, предпочтительно, имеют длину от приблизительно 8 до приблизительно 50 нуклеотидов. Антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие от приблизительно 9 до приблизительно 35 или более нуклеотидов, являются особенно предпочтительными. Авторы настоящего изобретения рассматривают все олигонуклеотидные композиции в диапазоне от 9 до 35 нуклеотидов (т.е., композиции 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, или 35 или более) как высоко предпочтительные в практическом осуществлении способов на основе антисмыслового олигонуклеотида по изобретению. Высоко предпочтительными областями-мишенями мРНК MASP-2 являются те, которые расположены в кодоне инициации трансляции AUG или около него, и последовательности, которые являются в основном комплементарными 5'-областям мРНК, например, между областями -10 и +10 нуклеотидной последовательности гена MASP-2 (SEQ ID NO: 4). Иллюстративные ингибиторы экспрессии MASP-2 представлены в табл. 5.

Таблица 5  
Иллюстративные ингибиторы экспрессии MASP-2

SEQ ID NO:30 (нуклеотиды 22-680 из SEQ ID NO:4)	Последовательность нуклеиновой кислоты кДНК MASP-2 (SEQ ID NO:4), кодирующая CUBIEGF
SEQ ID NO:31 5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCCTCTGGGC3'	Нуклеотиды 12-45 из SEQ ID NO:4, включая участок старта трансляции MASP-2 (смысловые)
SEQ ID NO:32 5'GACATTACCTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3'	Нуклеотиды 361-396 из SEQ ID NO:4, кодирующие область, содержащую участок связывания MBL MASP-2 (смысловые)
SEQ ID NO:33 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAA3'	Нуклеотиды 610-642 из SEQ ID NO:4, кодирующие область, содержащую домен CUBII

Как отмечено выше, термин "олигонуклеотид" в рамках изобретения относится к олигомеру или полимеру рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или к их миметикам. Этот термин включает также олигонуклеиновые основания, состоящие из природных нуклеотидов, сахаров и ковалентных межнуклеозидных связей (остова), также как олигонуклеотиды, имеющие неприродные модификации. Эти модификации позволяют вводить определенные желательные свойства, не предоставляемые природными олигонуклеотидами, такие как свойства уменьшенной токсичности, увеличение стабильности к нуклеазной деградации и улучшение поглощения клетками. В иллюстративных вариантах осуществления, антисмысловые соединения по изобретению отличаются от нативной ДНК вследствие модификации фосфодиэфирного остова для увеличения времени жизни антисмыслового олигонуклеотида, в котором фосфатные заместители заменены на фосфоротиоатные. Подобным образом, один или оба конца олигонуклеотида могут быть замещены одним или более акридиновыми производными, которые интеркалируют между соседними парами оснований в цепи нуклеиновой кислоты.

Другой альтернативой использования антисмысловых последовательностей является использование "РНК-интерференции" (РНКи). Двухцепочечные РНК (дцРНК) могут вызывать выключение гена у млекопитающих *in vivo*. Природной функцией РНКи и косупрессии, по-видимому, является защита генома от проникновения мобильных генетических элементов, таких как ретротранспозоны и вирусы, продуцирующие aberrантные РНК или дцРНК в клетке-хозяине при их активации (см., например, Jensen, J., et al., Nat. Genet. 21:209-212, 1999). Молекулу двухцепочечной РНК можно получать посредством синтеза двух цепей РНК, способных формировать молекулу двухцепочечной РНК, где каждая имеет длину приблизительно от 19 до 25 (например, 19-23 нуклеотидов). Например, молекула дцРНК, которую можно использовать в способах по изобретению, может содержать РНК, соответствующую последовательности и комплементарной ей последовательности, перечисленным в табл. 4. Предпочтительно, по меньшей мере одна цепь РНК имеет выступающий 3'-конец из 1-5 нуклеотидов. Синтезированные цепи РНК объединяют в условиях, позволяющих формирование двухцепочечной молекулы.

Последовательность РНК может содержать по меньшей мере часть из 8 нуклеотидов из SEQ ID NO: 4 с общей длиной 25 нуклеотидов или менее. Разработка последовательностей мРНК для данной мишени находится в компетенции специалиста в данной области. Доступны коммерческие услуги разработки последовательности мРНК, и они гарантируют по меньшей мере 70% нокдаун экспрессии (Qiagen, Valencia, Calif).

дцРНК можно вводить в форме фармацевтической композиции и осуществлять введение известными способами, где нуклеиновую кислоту вводится в желательную клетку-мишень. Общеизвестные способы переноса генов включают способы с использованием фосфата кальция, DEAE-декстрана, электропорации, микроинъекции и вирусов. Такие способы объяснены в Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1993.

Для уменьшения количества и/или биологической активности MASP-2 можно использовать также рибозимы, такие как рибозимы, нацеленные на мРНК MASP-2. Рибозимы представляют собой каталитические молекулы РНК, способные расщеплять молекулы нуклеиновой кислоты, имеющие последовательность, полностью или частично гомологичную последовательности рибозима. Можно разрабатывать рибозимные трансгены, кодирующие РНК-рибозимы, которые специфически спариваются с РНК-мишенью и расщепляют фосфодиэфирный остов в специфическом положении, таким образом, функционально инактивируя РНК-мишень. При проведении этого расщепления, сам рибозим не изменяется, и таким образом, является способным к повторению цикла и расщеплению других молекул. Включение рибозимных последовательностей в антисмысловые РНК придает им активность расщепления РНК, таким образом, увеличивая активность антисмысловых конструкций.

Рибозимы, которые можно использовать в практическом осуществлении изобретения, как правило, содержат гибридирующуюся область из по меньшей мере приблизительно девяти нуклеотидов, которая является комплементарной по нуклеотидной последовательности по меньшей мере части мРНК-мишени MASP-2, и каталитическую область, адаптированную для расщепления мРНК-мишени MASP-2 (см. в общем, EPA No. 0 321 201; WO88/04300; Haseloff, J., et al., Nature 334:585 591, 1988; Fedor, M.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1668 1672, 1990; Cech, T.R., et al., Ann. Rev. Biochem. 55:599 629, 1986).

Рибозимы можно также нацеливать непосредственно на клетки в форме олигонуклеотидов РНК, включающих рибозимные последовательности, или вводить в клетку в форме экспрессирующего вектора, кодирующего желательную рибозимную РНК. Рибозимы можно использовать и вводить по большей части таким же способом, какой описан для антисмысловых полинуклеотидов.

Антисмысловые РНК и ДНК, рибозимы и молекулы РНКи, которые можно использовать в способах по изобретению, можно получать любым способом, известным в данной области для синтеза молекул ДНК и РНК. Эти способы включают способы химического синтеза олигодезоксирибонуклеотидов и олигорибонуклеотидов, хорошо известные в данной области, например, такие как твердофазный фосфорамидитный химический синтез. Альтернативно, молекулы РНК можно получать посредством транскрипции *in vitro* и *in vivo* последовательностей ДНК, кодирующих молекулу антисмысловой РНК. Такие последовательности ДНК можно вставлять в широкое множество векторов, включающих подходящие промоторы для РНК-полимеразы, такие как промоторы для полимеразы T7 или SP6. Альтернативно, конструкции антисмысловой кДНК, синтезирующие антисмысловую РНК конституитивным или индуцируемым образом, в зависимости от используемого промотора, можно стабильно вводить в линии клеток.

Различные хорошо известные модификации молекул ДНК можно вводить в качестве средств для увеличения стабильности и времени полужизни. Модификации, которые можно использовать, включают, но без ограничения, добавление фланкирующих последовательностей рибонуклеотидов или дезоксирибонуклеотидов к 5'- и/или 3'-концам молекулы или использование фосфоротиоатных или 2'-О метильных вместо фосфодиэфирных связей внутри олигодезоксирибонуклеотидного остова.

#### V. Фармацевтические композиции и способы доставки.

##### Дозирование.

В другом аспекте изобретение относится к композициям для ингибирования неблагоприятных эффектов зависимой от MASP-2 активации комплемента у пациента, страдающего заболеванием или состоянием, как описано в настоящем описании, включая введение пациенту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество ингибирующего MASP-2 средства и фармацевтически приемлемый носитель. Ингибирующие MASP-2 средства можно вводить пациенту, в терапевтически эффективных дозах для лечения или облегчения состояний, ассоциированных с зависимой от MASP-2 активацией комплемента. Терапевтически эффективная доза относится к количеству ингибирующего MASP-2 средства, достаточный для облегчения симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием.

Токсичность и терапевтическую эффективность ингибирующих MASP-2 средств можно определять посредством стандартных фармацевтических способов с использованием экспериментальных моделей на животных, таких как мышьяная модель на мышах MASP-2<sup>-/-</sup>, экспрессирующих человеческий трансген MASP-2, описанная в примере 1. С использованием таких моделей на животных, NOAEL (уровень отсутствия наблюдаемых неблагоприятных эффектов) и MED (минимальную эффективную дозу) можно определять с использованием стандартных способов. Соотношение дозы между эффектами NOAEL и MED представляет собой терапевтический индекс, который выражают как соотношение NOAEL/MED. Ингибирующие MASP-2 средства, имеющие большие терапевтические индексы или показатели, являются наиболее предпочтительными. Данные, полученные из анализов культур клеток и исследований на животных, можно использовать для составления диапазона доз для использования для человека. Доза ингибирующего MASP-2 средства предпочтительно лежит в диапазоне циркулирующих концентраций, включающем MED с небольшой токсичностью или отсутствием токсичности. Дозу можно менять в пределах этого диапазона в зависимости от формы используемой дозируемой формы и используемого способа введения.

Для получения состава любого соединения, терапевтически эффективную дозу можно оценивать с использованием моделей на животных. Например, дозу можно составлять в модели на животных для достижения диапазона циркулирующей в плазме концентрации, включающего MED. Количественные

уровни ингибирующего MASP-2 средства в плазме также можно измерять, например, посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение к исследованиям токсичности, эффективную дозу можно также оценивать на основании количества белка MASP-2, присутствующего в живом индивиду, и аффинности связывания ингибирующего MASP-2 средства. Показано, что MASP-2 у здоровых людей в сыворотке на низких уровнях в диапазоне около 500 нг/мл, и уровни MASP-2 у конкретного индивида можно определять с использованием количественного анализа MASP-2, описанного в Moller Kristensen M., et al., *J. Immunol. Methods* 282:159-167, 2003.

В общем, дозу вводимых композиций, содержащих ингибирующие MASP-2 средства, меняется в зависимости от таких факторов, как возраст, масса, рост, пол, общее медицинское состояние и предшествующий медицинский анамнез пациента. В качестве иллюстрации, ингибирующие MASP-2 средства, такие как антитела против MASP-2, можно вводить в дозе, лежащей в диапазоне приблизительно от 0,010 до 10,0 мг/кг, предпочтительно, от 0,010 до 1,0 мг/кг, более предпочтительно, от 0,010 до 0,1 мг/кг массы тела индивида. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит комбинацию антител против MASP-2 и ингибирующих MASP-2 пептидов.

Терапевтическую эффективность ингибирующих MASP-2 композиций и способов по настоящему изобретению для данного индивида, и подходящих дозы можно определять в соответствии с анализами комплемента, хорошо известными специалисту в данной области. Комплемент образует многочисленные специфические продукты. За последнее десятилетие разработаны чувствительные и специфические анализы, и они являются коммерчески доступными для большинства из данных продуктов активации, включая малые фрагменты активации C3a, C4a и C5a, и большие фрагменты активации iC3b, C4d, Bb и sC5b 9. В большинстве этих анализов используют моноклональные антитела, вступающие в реакцию с новыми антигенами (неоантигенами), экспонированными на этих фрагментах, но не на нативных белках, из которых они образованы, что делает эти анализы очень простыми и специфическими. Большинство основано на технологии ELISA, хотя радиоиммунный анализ еще иногда используют для C3a и C5a. В этих последних анализах измеряют как непротессированные фрагменты, так и их фрагменты "desArg", которые являются основными формами, обнаруживаемыми в кровотоке. Непротессированные фрагменты и C5a<sub>desArg</sub> быстро выводятся посредством связывания с рецепторами клеточной поверхности, и аге таким образом, присутствуют в очень низких концентрациях, в то время как C3a<sub>desArg</sub> не связывается с клетками и накапливается в плазме. Измерение C3a обеспечивает чувствительный, не зависящий от пути показатель активации комплемента. Активацию альтернативного пути можно оценивать посредством измерения количества фрагмента Bb. Детекция растворимого продукта активации мембраноатакующего пути, sC5b 9, предоставляет доказательства того, что комплемент активируется полностью. Поскольку как лектиновый, так и классический пути образуют одинаковые продукты активации, C4a и C4d, измерение количества этих двух фрагментов не предоставляет никакой информации о том, в каком из этих двух путей образованы продукты активации.

Ингибирование зависимой от MASP-2 активации комплемента характеризуется по меньшей мере одним из следующих изменений компонента системы комплемента, возникающим в результате введения ингибирующего MASP-2 средства в соответствии со способами по изобретению: ингибирование образования или продукции продуктов зависимой от MASP-2 системы активации комплемента C4b, C3a, C5a и/или C5b 9 (MAC) (измеренное, например, как описано в примере 2, уменьшение расщепления C4 и накопления C4b (измеренное, например, как описано в примере 10), или уменьшение расщепления C3 и накопления C3b (измеренное, например, как описано в примере 10).

Дополнительные средства.

Композиции и способы, включающие ингибирующие MASP-2 средства, могут, необязательно, содержать одно или несколько дополнительных лекарственных средств, которые могут усиливать активность ингибирующего MASP-2 средства, или которые обеспечивают родственные терапевтические функции аддитивным или синергическим образом. Например, в контексте лечения индивида, страдающего зависимым от ангиогенеза заболеванием или состоянием, одно или несколько ингибирующих MASP-2 средств можно вводить в комбинации (включая совместное введение) с одним или несколькими дополнительными антиангиогенными (также обозначенными как ангиостатическими) средствами и/или с одним или несколькими химиотерапевтическими средствами.

Ингибирующие MASP-2 средства можно использовать в комбинации с другими антиангиогенными средствами, например, такими как антагонисты VEGF, такие как антитела, связывающиеся с VEGF, такие как антитело, известное как "бевацизумаб (BV)" (также известный как АВАСТИН®), антитела, связывающиеся с VEGF-A, или VEGF-C, или с рецептором VEGF-A (например, рецептором KDR или рецептором Flt-1), ингибиторы против PDGFR, такие как Гливек® (мезилат иматиниба), малые молекулы, блокирующие передачу сигнала рецептора VEGF (например, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT.RTM./SU11248 (сунитиниб малат)), AMG706, или описанные, например, в Международной патентной заявке WO 2004/113304. Антиангиогенные средства включают также природные ингибиторы ангиогенеза, например, ангиостатин, эндостатин и т.д. См., например, Klagsbrun and D'Amore (1991) An-

nu. Rev. Physiol. 53:217-39; Streit and Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179 (например, табл. 3 с перечислением антиангиогенных лекарственных средств при злокачественной меланоме); Ferrara & Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12):1359-1364; Tonini et al. (2003) *Oncogene* 22:6549-6556 (например, табл. 2 с перечислением известных антиангиогенных факторы); и Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206 (например, табл. 1 с перечислением антиангиогенных средств, использованных в клинических исследованиях).

Ингибирующие MASP-2 средства можно использовать в комбинации с другими противораковыми и/или химиотерапевтическими средствами, например, такими как абареликс, актиномицин D, адриамицин, альдеслейкин, алемтузумаб, алитретиноин, аллопуринол, алтретамин, амифостин, анакинра, анастразол, триоксид мышьяка, аспарагиназа, азациитидин, BCG Live, бевацизумаб, бексаротен, блеомицин, бортезомиб, бусульфид, калюстерон, капецитабин, карбоплатин, кармустин, целекоксиб, цетуксимаб, хлорамбуцил, цисплатин, кладрибин, клофарабин, циклофосфамид, цитарабин, декарбазин, дактиномицин, дальтепарин (например, натрия), дарбепозин-альфа, дазатиниб, даунорубин, дауномицин, децитабин, денилейкин, денилейкин-дифтитокс, дексразоксан, доцетаксел, доксорубин, пропионат дромо-станолона, экулизумаб, эпирубицин (например, HCl), эпоэтин-альфа, эрлотиниб, эстрамустин, этопозид (например, фосфат), экземестан, фентанил (например, цитрат), филграстим, флоксуридин, флударабин, фторурацил, 5-FU, фулвезтант, гефитиниб, гемцитабин (например, HCl), гемтузумаб-озогамицин, гозерелин (например, ацетат), гистрелин (например, ацетат), гидроксимочевина, ибригутамаб тиуксетан, идарубин, ифосфамид, иматиниб (например, мезилат), интерферон-альфа-2b, иринотекан, дитозилат лапатиниба, леналидомид, лектрозол, лейковорин, леупролид (например, ацетат), левамизол, ломустин, CCNU, мехлорэтамин (азотистый иприт), магестрол, мелфалан (L-PAM), меркаптопурин (6-MP), месна, метотрексат, метоксален, митомицин C, митотан, митоксантрон, фенпропионат нандролона, nélарабин, нофетумомаб, опрелвекин, оксалиплатин, паклитаксел, палифермин, памидронат, панитумумаб, пегадемаза, пегаспаргаза, пэгфилграстим, пэгинтерферон-альфа-2b, пеметрексед (например, динатрия), пентостатин, пипоброман, пликамицин (митрамицин), порфимер (например, натрия), прокарбазин, хинакрин, расбуриказа, ритуксимаб, сарграмостим, сорафениб, стрептозоцин, сунитиниб (например, малеат), тальк, тамоксифен, темозоломид, тенипозид (VM-26), тестолактон, талидомид, тиогуанин (6-TG), тиотепа, топотекан (например, hcl), торемифен, Тозитумомаб/I-131 (тозитумомаб), трастузумаб, третиноин (ATRA), урамустин, валрубицин, винбластин, винкристин, винорелбин, вориносат, золедронат и золедроновая кислота.

Фармацевтические носители и средства для доставки.

Как правило, композиции ингибирующего MASP-2 средства по настоящему изобретению, в комбинации с любыми другими выбранными лекарственными средствами, подходящим образом содержатся в фармацевтически приемлемом носителе. Носитель является нетоксичным, биосовместимым, и выбранным таким образом, чтобы не оказывать неблагоприятное влияние на биологическую активность ингибирующего MASP-2 средства (и любых других лекарственных средств в комбинации с ним). Иллюстративные фармацевтические приемлемые носители для пептидов описаны в Патенте США No. 5211657 от Yamada. Антитела против MASP-2 и ингибирующие пептиды, которые можно использовать по изобретению, можно составлять в препараты в твердой, полужидкой, гелеобразной, жидкой или газообразной формах, таких как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, депозитории, средства для ингаляций и инъекций, позволяющие пероральное, парентеральное или хирургическое введение. Изобретение относится также к местному введению композиций посредством покрытия медицинских инструментов и т.д.

Пригодные носители для парентеральной доставки посредством инъекции, инфузии или орошения и местной доставки, включают дистиллированную воду, забуференный фосфатом физиологический раствор, нормальный или содержащий лактат растворы Рингера, раствор декстрозы, раствор Хэнка или пропандиол. Кроме того, стерильные, жирные масла можно использовать в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для этой цели можно использовать любое биосовместимое масло, включая синтетические или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, можно использовать для получения средств для инъекций. Носитель и средство можно объединять в форме жидкости, суспензии, способного или не способного к полимеризации геля, пасты или бальзама.

Носитель может также содержать средство для доставки для замедления (т.е., продления, задержки или регуляции) доставки средства(средств) или для улучшения доставки, поглощения, стабильности или фармакокинетики лекарственного средства(средств). Такое средство для доставки может включать, в качестве неограничивающего примера, микрочастицы, микросферы, наносферы или наночастицы, состоящие из белков, липосом, углеводов, синтетические органические соединения, неорганические соединения, полимерные или сополимерные гидрогели и полимерные мицеллы. Подходящие системы доставки на основе гидрогелей и мицелл включают сополимеры PEO:PHB:PEO и сополимерные/циклодекстриновые комплексы, описанные в WO 2004/009664 A2, и PEO и PEO/циклодекстриновые комплексы, описанные в Публикации патентной заявки США No. 2002/0019369 A1. Такие гидрогели можно инъецировать местно в участке намеченного воздействия, или подкожно или внутримышечно для формирования депо для замедленного высвобождения.

Для внутрисуставной доставки, носителем для ингибирующего MASP-2 средства могут являться

вышеописанные жидкие или гелеобразные носители, пригодные для инъекций, вышеописанные средства для доставки с замедленным высвобождением, пригодные для инъекций, или гиалуроновая кислота или производное гиалуроновой кислоты.

Для перорального введения непептидергических средств, носителем для ингибирующего MASP-2 средства могут являться инертный наполнитель или разбавитель, такой как сахароза, кукурузный крахмал или целлюлоза.

Для местного введения, носителем для ингибирующего MASP-2 средства могут являться мазь, лосьон, крем, гель, капли, суппозиторий, спрей, жидкость или порошок, или гелевые или микрокапсульные системы доставки посредством чрескожного пластыря.

Различные назальные и легочные системы доставки, включая аэрозоли, дозирующие ингаляторы, ингаляторы сухого порошка и распылители, находятся на стадии разработки и могут быть соответствующим образом адаптированы для доставки по настоящему изобретению в аэрозольном, ингаляционном или распыленном средстве для доставки, соответственно.

Для интратекальной (IT) или интрацеребровентрикулярной (ICV) доставки, соответствующие стерильные системы доставки (например, жидкости; гели, суспензии и т.д.) можно использовать для доставки по настоящему изобретению.

Композиции по настоящему изобретению могут также включать биосовместимый наполнители, такие как диспергирующие или увлажняющие средства, суспендирующие средства, разбавители, буферы, усиливающие проникновение средства, эмульгаторы, связующие вещества, загустители, вкусовые добавки (для перорального введения).

Фармацевтические носители для антител и пептидов.

Более конкретно, применительно к антителам против MASP-2 и ингибирующим пептидам, иллюстративные составы можно вводить парентерально в форме пригодных для инъекций доз раствора или суспензии соединения в физиологически приемлемом разбавителе с фармацевтическим носителем, который может представлять собой стерильную жидкость, такую как вода, масла, солевой раствор, глицерин или этанол. Кроме того, вспомогательные вещества, такие как увлажняющие средства или эмульгаторы, поверхностно-активные вещества, забуферивающие pH вещества и т.п., могут присутствовать в композициях, содержащих антитела против MASP-2 и ингибирующие пептиды. Дополнительные компоненты фармацевтических композиций включают горючее и смазочные материалы (например, животного, растительного или синтетического происхождения), например, соевое масло и минеральное масло. Как правило, гликоли, такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, являются предпочтительными жидкими носителями для пригодных для инъекций растворов.

Антитела против MASP-2 и ингибирующие пептиды можно также вводить в форме инъекций-депо или имплантируемого препарата, которые можно составлять таким образом, чтобы позволять замедленное или пульсирующее высвобождение действующих веществ.

Фармацевтически приемлемые носители для ингибиторов экспрессии.

Более конкретно, применительно к ингибиторам экспрессии, которые можно использовать в способах по изобретению, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим ингибитор экспрессии, как описано выше, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Композиция может дополнительно содержать коллоидную дисперсионную систему.

Фармацевтические композиции, содержащие ингибиторы экспрессии, могут включать, но без ограничения, растворы, эмульсии и содержащие липосомы составы. Эти композиции можно получать из множества компонентов, включающих, но без ограничения, заранее приготовленные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. Получение таких композиций, как правило, включает объединение ингибитора экспрессии с одним или несколькими из следующих: буферы, антиоксиданты, низкомолекулярные полипептиды, белки, аминокислоты, углеводы, включая глюкозу, сахарозу или декстрины, хелатирующие агенты, такие как ЭДТА, глутатион и другие стабилизаторы и наполнители. Нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с неспецифическим сывороточным альбумином, представляют собой примеры подходящих разбавителей.

В некоторых вариантах осуществления, композиции можно получать и составлять в форме эмульсий, как правило, представляющих собой гетерогенные системы из одной жидкости, диспергированной в другой в форме капель (см., Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Vol. 1, Rieger and Banker (eds.), Marcek Dekker, Inc., N.Y., 1988). Примеры природных эмульгаторов, используемых в эмульсионных составах, включают гуммиарабик, пчелиный воск, ланолин, лецитин и фосфатиды.

В одном варианте осуществления, композиции, содержащие нуклеиновые кислоты, можно составлять в форме микроэмульсий. Микроэмульсия, в рамках изобретения, относится к системе из воды, масла и амфифильного вещества, которая представляет собой одиночный оптически однородный и термодинамически стабильный жидкий состав (см. Rosoff in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Vol. 1). В способе по изобретению можно также использовать липосомы для переноса и доставки антисмысловых олигонуклеотидов в желательный участок.

Фармацевтические композиции и составы ингибиторов экспрессии для местного введения могут

включать чрескожные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Можно использовать общепринятые фармацевтические носители, так же как водные, порошкообразные или масляные основы и загустители, и т.п.

Способы введения.

Фармацевтические композиции, содержащие ингибирующие MASP-2 средства, можно вводить множеством способов, в зависимости от того, местный или системный способ введения является наиболее подходящим для состояния, подвергаемого лечению. Кроме того, композиции по настоящему изобретению можно доставлять посредством покрытия композициями имплантируемого медицинского устройства или включения композиций в имплантируемое медицинское устройство.

Системная доставка.

В рамках изобретения, термины "системная доставка" и "системное введение" включают, но без ограничения, пероральный и парентеральный способы, включая внутримышечный (IM), подкожный, внутривенный (IV), внутриартериальный, ингаляционный, подъязычный, буккальный, местный, чрескожный, назальный, ректальный, вагинальный и другие способы введения, которые эффективно приводят к распределению доставляемого средства в одном или множестве участков намеченного терапевтического действия. Предпочтительные способы системной доставки настоящих композиций включают внутривенный, внутримышечный, подкожный и ингаляционный. Следует учитывать, что точный способ системного введения для выбранных средств, используемых в конкретных композициях по настоящему изобретению, можно определять частично с учетом чувствительности средства к путям метаболического превращения, ассоциированным с данным способом введения. Например, пептидергические средства можно наиболее подходящим образом вводить способами, отличными от перорального.

Ингибирующие MASP-2 антитела и полипептиды можно доставлять пациенту любыми подходящими способами. Способы доставки антител и полипептидов MASP-2 включают пероральное, легочное, парентеральное введение (например, внутримышечную, внутривенную (IV) или подкожную инъекцию), ингаляцию (например, в составе тонкоизмельченного порошка), чрескожный, назальный, вагинальный, ректальный или подъязычный способы введения, и можно получать составы лекарственных форм, подходящие для каждого способа введения.

В качестве репрезентативного примера, ингибирующие MASP-2 антитела и пептиды можно вводить в живой организм посредством нанесения на оболочку в организме, способную абсорбировать полипептиды, например, слизистые оболочки носа, желудочно-кишечного тракта и прямой кишки. Полипептиды, как правило, наносят на абсорбирующую оболочку в сочетании с усиливающим проникновение средством. (См., например, Lee, V.H.L., *Crit. Rev. Ther. Лекарственное средство Носитель Sys.* 5:69, 1988; Lee, V.H.L., *J. Controlled Release* 13:213, 1990; Lee, V.H.L., Ed., *Peptide and Protein Drug Delivery*, Marcel Dekker, New York (1991); DeBoer, A.G., et al., *J. Controlled Release* 13:241, 1990.) Например, STDHF представляет собой синтетическое производное фусидовой кислоты, стероидное поверхностно-активное вещество, которое является сходным по структуре с солями желчных кислот желчных кислот, и которое использовали в качестве усиливающего проникновение средства для назальной доставки. (Lee, W.A., *Bio-pharm.* 22, Nov./Dec. 1990.)

Ингибирующие MASP-2 антитела и полипептиды можно вводить в сочетании с другой молекулой, такой как липид, для защиты полипептидов от ферментной деградации. Например, ковалентное присоединение полимеров, особенно полиэтиленгликоля (PEG), использовали для защиты конкретных белков от ферментного гидролиза в организме и таким образом, продления времени полужизни (Fuertges, F., et al., *J. Controlled Release* 11:139, 1990). Опубликовано множество полимерных систем для доставки белков (Bae, Y.H., et al., *J. Controlled Release* 9:271, 1989; Hori, R., et al., *Pharm. Res.* 5:813, 1989; Yamakawa, I., et al., *J. Pharm. Sci.* 79:505, 1990; Yoshihiro, I., et al., *J. Controlled Release* 10:195, 1989; Asano, M., et al., *J. Controlled Release* 9:111, 1989; Rosenblatt, J., et al., *J. Controlled Release* 9:195, 1989; Makino, K., *J. Controlled Release* 12:235, 1990; Takakura, Y., et al., *J. Pharm. Sci.* 78:117, 1989; Takakura, Y., et al., *J. Pharm. Sci.* 78:219, 1989).

Недавно разработаны липосомы с улучшенной стабильностью в сыворотке и временем полужизни в кровотоке (см., например, Патент США No. 5741516, от Webb). Кроме того, приведен обзор различных способов с использованием липосом и подобных липосомам препаратов в качестве потенциальных носителей для лекарственных средств (см., например, Патент США No. 5567434, от Szoka; патент США No. 5552157, от Yagi; патент США No. 5565213, от Nakamori; патент США No. 5738868, от Shinkarenko; и Патент США No. 5795587, от Gao).

Для чрескожных введений, ингибирующие MASP-2 антитела и полипептиды можно комбинировать с другими пригодными ингредиентами, такими как носители и/или адъюванты. Не существует ограничений применительно к природе таких других ингредиентов, за исключением того, что они должны являться фармацевтически приемлемыми для намеченного для них введения, и не могут нарушать активность активных ингредиентов композиции. Примеры пригодных средств включают мази, кремы, гели или суспензии, содержащие или не содержащие очищенный коллаген. Ингибирующие MASP-2 антитела и полипептиды можно также вкраплять в чрескожные накладки, пластыри и биндажи, предпочтительно, в жидкой или полужидкой форме.



Композиции по настоящему изобретению можно вводить системно на периодической основе с интервалами, определенными для поддержания желательного уровня терапевтического эффекта. Например, композиции можно вводить, например, посредством подкожной инъекции, каждые две-четыре недели или с менее частыми интервалами. Режим дозирования определяет терапевт с учетом различных факторов, которые могут оказывать влияние на действие комбинации средств. Эти факторы включают степень прогрессирования подвергаемого лечению состояния, возраст, пол и массу пациента, и другие клинические факторы. Дозу для каждого индивидуального средства можно менять в зависимости от ингибирующего MASP-2 средства, включенного в композицию, так же как от присутствия и природы любого средства для доставки лекарственного средства (например, средства для доставки с замедленным высвобождением). Кроме того, уровень дозирования можно корректировать с учетом изменения частоты введения и фармакокинетического поведения доставляемого средства(средств).

#### Местная доставка.

В рамках изобретения, термин "местное" включает введение лекарственного средство в участок или около участка намеченного местного действия, и может включать, например, местную доставку на кожу или в другие пораженные ткани, офтальмологическую доставку, интратекальное (IT), интрацеребровентрикулярное (ICV), внутрисуставное, внутрисуставное, интракраниальное или внутримышечное введение, наложение или орошение. Местное введение может являться предпочтительным для обеспечения возможности введения более низкой дозы, для избегания системных побочных эффектов и для более точного контроля времени доставки и концентрации действующих веществ в участке местной доставки. Местное введение обеспечивает известную концентрацию в участке-мишени, вне зависимости от изменчивости между пациентами метаболизма, кровотока и т.д. Улучшенный контроль дозирования также обеспечивается посредством прямого способа доставки.

Местную доставку ингибирующего MASP-2 средства можно осуществлять в контексте хирургических способов лечения зависящего от ангиогенеза заболевания или состояния, например, в ходе таких процедур, как хирургическое вмешательство в глаз или связанное со злокачественной опухолью хирургическое вмешательство.

#### Режимы лечения.

При профилактических применениях, фармацевтические композиции, содержащие ингибирующее MASP-2 средство, вводят пациенту, чувствительному к зависящему от ангиогенеза заболеванию или состоянию, или иным образом подверженному риску развития зависящего от ангиогенеза заболевания или состояния, в количестве, достаточном для ингибирования ангиогенеза и таким образом, исключения или уменьшения риска развития симптомов этого состояния. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции вводят индивиду, у которого подозревают наличие, или который уже страдает от зависящего от ангиогенеза заболевания или состояния, в терапевтически эффективном количестве, достаточном для облегчения или по меньшей мере частичного уменьшения, симптомов этого состояния. Как в профилактических, так и в терапевтических режимах, композиции, содержащие ингибирующие MASP-2 средства, можно вводить в нескольких дозах до достижения удовлетворительного терапевтического исхода для пациента. Применение ингибирующих MASP-2 композиций по настоящему изобретению можно осуществлять посредством однократного введения композиции, или ограниченной серии введений, для лечения острого состояния, ассоциированного с ангиогенезом. Альтернативно, композицию можно вводить с периодическими интервалами в течение продолжительного периода времени для лечения хронического состояния, ассоциированного с ангиогенезом.

Как в профилактических, так и в терапевтических режимах, композиции, содержащие ингибирующие MASP-2 средства, можно вводить в нескольких дозах до достижения удовлетворительного терапевтического исхода для пациента. В одном варианте осуществления изобретения, ингибирующее MASP-2 средство содержит антитело против MASP-2, которое подходящим образом можно вводить взрослому пациенту (например, при средней массе взрослого 70 кг) в дозе от 0,1 мг до 10000 мг, более подходящим образом, от 1,0 мг до 5000 мг, более подходящим образом, от 10,0 мг до 2000 мг, более подходящим образом, от 10,0 мг до 1000 мг и еще более подходящим образом, от 50,0 мг до 500 мг. Для пациентов детского возраста, дозу можно корректировать пропорционально массе пациента. Применение ингибирующих MASP-2 композиций по настоящему изобретению можно осуществлять посредством однократного введения композиции, или ограниченной серии введений, для лечения пациента, страдающим или подверженным риску развития зависящего от ангиогенеза заболевания или состояния, такого как зависящая от ангиогенеза злокачественная опухоль, зависящая от ангиогенеза доброкачественная опухоль или ангиогенное заболевание или состояние глаз. Альтернативно, композицию можно вводить с периодическими интервалами, например, ежедневно, дважды в неделю, один раз в неделю, каждую вторую неделю, раз в месяц или раз в два месяца в течение продолжительного периода времени для лечения индивида, страдающего или подверженного риску развития зависящего от ангиогенеза заболевания или состояния, такого как зависящая от ангиогенеза злокачественная опухоль, зависящая от ангиогенеза доброкачественная опухоль или ангиогенное заболевание или состояние глаз.

Как в профилактических, так и в терапевтических режимах, композиции, содержащие ингибирующие MASP-2 средства, можно вводить в нескольких дозах до достижения удовлетворительного терапев-

тического исхода для индивида.

В одном варианте осуществления, фармацевтическую композицию, содержащую ингибирующее MASP-2 средство, вводят индивиду, страдающему от офтальмологического ангиогенного заболевания или состояния, в количестве, эффективном для ингибирования ангиогенеза. В одном варианте осуществления, офтальмологическое ангиогенное заболевание или состояние глаз выбрано из группы, состоящей из AMD, увеита, меланомы глаза, неоваскуляризации роговицы, первичного птеригия, стромального кератита HSV, индуцированного HSV-1 лимфангиогенеза роговицы, пролиферативной диабетической ретинопатии, ретинопатии недоношенных, окклюзии вен сетчатки, отторжения трансплантата роговицы, неоваскулярной глаукомы и покраснения радужки.

В другом варианте осуществления, фармацевтическую композицию, содержащую ингибирующее MASP-2 средство, вводят индивиду, страдающему от зависимой от ангиогенеза злокачественной опухоли, в количестве, эффективном для ингибирования ангиогенеза. В одном варианте осуществления, зависимая от ангиогенеза злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из солидной опухоли(опухолей), передающихся через кровь опухолей, карциноидных опухолей высокого риска и метастазов опухолей. В одном варианте осуществления, композицию вводят в количестве, эффективном для ингибирования ангиогенеза опухоли. В одном варианте осуществления, пациент страдает от или подвержен риску метастазирования опухолей, и композицию вводят в количестве, эффективном для ингибирования метастазирования опухолей. В одном варианте осуществления, пациент страдает от зависимой от ангиогенеза злокачественной опухоли, выбранной из группы, состоящей из колоректальной злокачественной опухоли, злокачественной опухоли молочной железы, легкого, почек, печени, пищевода, яичников, поджелудочной железы, предстательной железы, желудка, глиомы, стромальной опухоли желудочно-кишечного тракта, лимфомы, меланомы и карциноидной опухоли. В одном варианте осуществления, пациент страдает от доброкачественной опухоли, и композицию вводят в количестве, эффективном для ингибирования ангиогенеза доброкачественной опухоли.

#### VI. Примеры.

Следующие примеры являются только иллюстрациями наилучшего способа практического осуществления изобретения, однако, их не следует рассматривать как ограничивающие изобретение. Содержание всех цитируемых литературных источников явным образом включено в настоящее описание в качестве ссылки.

#### Пример 1.

В этом примере описано получение линии мышей с недостаточностью MASP-2 (MASP-2<sup>-/-</sup>), но полных по MAr19 (MAr19<sup>+/+</sup>).

Материалы и способы: Нацеливающий вектор рКО NTKV 1901 разработан для разрушения трех экзонов, кодирующих С-конец мышинового MASP-2, включая экзон, который кодирует домен сериновой протеазы, как показано на фиг. 3. РКО NTKV 1901 использовали для трансфекции линии клеток мышей ES E14.1a (SV129 Ola). Отобраны клоны, устойчивые к неомицину и чувствительные к тимидинкиназе. 600 ES клонов подвергнуты скринингу и из них идентифицировано четыре различных клона и посредством Саузерн-блоттинга верифицировано, что они содержат ожидаемые селективные нацеливающие и рекомбинантные события, как показано на фиг. 3. Из этих четырех положительных клонов получены химеры посредством переноса эмбрионов. Затем химеры подвергали обратному скрещиванию на генетическом фоне C57/BL6 для получения трансгенных самцов. Трансгенных самцов скрещивали с самками для получения потомков F1 с 50% потомства, проявляющего гетерозиготность по нарушенному гену MASP-2. Гетерозиготных мышей подвергали перекрестному скрещиванию для получения гомозиготного потомства с недостаточностью MASP-2, в результате чего получены гетерозиготные мыши и мыши дикого типа в соотношении 1:2:1, соответственно.

Результаты и фенотип: Обнаружено, что полученные в результате гомозиготные мыши MASP-2<sup>-/-</sup> (т.е., с недостаточностью по гену-мишени) являются жизнеспособными и фертильными, и они были проверены на недостаточность MASP-2 посредством Саузерн-блоттинга для подтверждения правильного события нацеливания, посредством нозерн-блоттинга для подтверждения отсутствия мРНК MASP-2, и посредством вестерн-блоттинга для подтверждения отсутствия белка MASP-2 (данные не представлены). Присутствие мРНК MAr19 и отсутствие мРНК MASP-2 дополнительно подтверждены с использованием RT-ПЦР с разрешением во времени на устройстве LightCycler. Как и ожидалось, мыши MASP-2<sup>-/-</sup> действительно продолжали экспрессировать мРНК и белок MAr19, MASP-1 и MASP-3 (данные не представлены). Присутствие и относительное содержание мРНК пропердина, фактора В, фактора D, С4, С2 и С3 у мышей MASP-2<sup>-/-</sup> оценивали посредством анализа в LightCycler и обнаружили, что они идентичны этим данным для контрольных однопометных животных дикого типа (данные не представлены). Плазма от гомозиготных мышей MASP-2<sup>-/-</sup> обладает абсолютной недостаточностью опосредованной лектиновым путем активации комплемента, как описано далее в примере 2.

Получение линии MASP-2<sup>-/-</sup> на чистом фоне C57BL6: мышей MASP-2<sup>-/-</sup> подвергали обратному скрещиванию с чистой линией C57BL6 в течение девяти поколений перед использованием линии MASP-2<sup>-/-</sup> в качестве экспериментальной модели на животных.

Трансгенную линию мышей, которая имеет мышинный MASP-2<sup>-/-</sup>, мышинный MAr19<sup>+/+</sup>, и которая

экспрессирует человеческий трансген MASP-2 (с нокаутом мышинового MASP-2 и нокином человеческого MASP-2) также получали следующим образом:

Материалы и способы. Сконструирован миниген, кодирующий человеческий MASP-2, названный "мини-hMASP-2" (SEQ ID NO: 49), как показано на фиг. 4, включающий промоторную область человеческого гена MASP-2, включая первые 3 экзона (экзон 1 -экзон 3), за которой следует последовательность кДНК, представляющая кодирующую последовательность следующих 8 экзонов, таким образом, кодирующий полноразмерный белок MASP-2 под контролем его эндогенного промотора. Конструкцию мини-hMASP-2 инъецировали в оплодотворенные яйцеклетки MASP-2-/- с целью замещения инактивированного мышинового гена MASP-2 на трансгенно экспрессируемый человеческий MASP-2.

Пример 2.

В этом примере показано, что MASP-2 является необходимым для активации комплемента посредством лектинового пути.

Способы и материалы.

Анализ специфического для лектинового пути расщепления C4: в Petersen, et al., J. Immunol. Methods 257:107 (2001) описан анализ расщепления C4, в котором измеряют активацию лектинового пути, происходящую в результате воздействия липотейхоевой кислоты (LTA) из *S. Aureus*, которая связывает L-фиколин. Анализ, описанный в Petersen et al., (2001), адаптирован для измерения уровня активации лектинового пути посредством MBL при помощи покрытия планшета LPS и маннаном или зимозаном перед добавлением сыворотки от мышей MASP-2-/-, как описано ниже. Анализ модифицировали также для исключения возможности расщепления C4 посредством классического пути. Этого достигали посредством использования буфера для разведения образцов, содержащего 1 M NaCl, который позволяет высокоаффинное связывание узнающих компонентов лектинового пути активации с их лигандами, но предотвращает активацию эндогенного C4, таким образом, исключая участие классического пути посредством диссоциации комплекса C1. В кратком описании, в модифицированном анализе образцы сыворотки (разведенные в буфере с большим содержанием соли (1 M NaCl)) добавляют в покрытые лигандом планшеты, с последующим добавлением постоянного количества очищенного C4 в буфере с физиологической концентрацией соли. Связанные узнающие комплексы, содержащие MASP-2, расщепляют C4, что приводит к накоплению C4b.

Способы анализа.

7) Микропланшеты для титрования Nunc Maxisorb (Maxisorb, Nunc, кат. No. 442404, Fisher Scientific) покрывали с использованием 1 мкг/мл маннана (M7504, Sigma) или любого другого лиганда (например, такого как перечисленные ниже), разведенного в покрывающем буфере (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6).

Следующие реагенты использованы в анализе:

а) маннан (1 мкг/лунку маннана (M7504, Sigma) в 100 мкл покрывающего буфера);  
 б) зимозан (1 мкг/лунку зимозан (Sigma) в 100 мкл покрывающего буфера);  
 в) LTA (1 мкг/лунку в 100 мкл покрывающего буфера или 2 мкг/лунку в 20 мкл метанола)  
 д) 1 мкг специфического для H-фиколина Mab 4H5 в покрывающем буфере  
 е) PSA из *Aegococcus viridans* (2 мкг/лунку в 100 мкл покрывающего буфера)  
 ф) 100 мкл/лунку фиксированного формалином *S. Aureus* DSM20233 (OD<sub>550</sub>=0,5) в покрывающем буфере.

2) Планшеты инкубировали в течение ночи при 4°C.

3) После инкубации в течение ночи, остаточные участки связывания белков подвергали насыщению посредством инкубации планшетов с блокирующим буфером 0,1% HSA-TBS (0,1% (мас./об.) HSA в 10 mM Трис-CL, 140 mM NaCl, 1,5 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,4) в течение 1-3 часов, затем планшеты промывали 3X с использованием TBS/tween/Ca<sup>2+</sup> (TBS с 0,05% Tween 20 и 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4).

4) Образцы сыворотки для тестирования разводили в связывающем буфере MBL (1 M NaCl), и разведенные образцы добавляли в планшеты и инкубировали в течение ночи при 4°C. Лунки с добавлением только буфера использовали в качестве отрицательного контроля.

5) После инкубации в течение ночи при 4°C, планшеты промывали 3X с использованием TBS/tween/Ca<sup>2+</sup>. Затем C4 человека (100 мкл/лунку 1 мкг/мл, разведенного в BBS (4 mM барбитал, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4)), добавляли в планшеты и инкубировали в течение 90 минут at 37°C. Планшеты снова промывали 3X с использованием TBS/tween/Ca<sup>2+</sup>.

6) Накопление C4b детектировали с использованием конъюгированных с щелочной фосфатазой антител курицы против C4с человека (разведенных 1:1000 в TBS/tween/Ca<sup>2+</sup>), которые добавляли в планшеты и инкубировали в течение 90 мин при комнатной температуре. Затем планшеты снова промывали 3X с использованием TBS/tween/Ca<sup>2+</sup>.

7) Щелочную фосфатазу детектировали посредством добавления 100 мкл раствора субстрата п-нитрофенилфосфата, инкубации при комнатной температуре в течение 20 минут, и считывания OD<sub>405</sub> в считывателе для микропланшетов для титрования.

Результаты. На фиг. 5А В показан уровень накопления C4b на маннана (фиг. 5А) и зимозане (фиг. 5В) в разведениях сывороток от MASP-2+/+ (кресты), MASP-2+/- (сплошные круги) и MASP-2-/-

(сплошные треугольники). На фиг. 5С показана относительная активность конвертазы С4 в планшетах, покрытых зимозаном (белые столбцы) или маннаном (заштрихованные столбцы) для мышей MASP-2 +/- (n=5) и мышей MASP-2-/- (n=4) по сравнению с мышами дикого типа (n=5), на основании измерения уровня накопления С4b, нормализованного по сыворотке дикого типа. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение. Как показано на фиг. 5А С, плазма от мышей MASP-2-/- абсолютно лишена опосредованной лектиновым путем активации комплемента в покрытых маннаном и в покрытых зимозаном планшетах. Эти результаты явно показывают, что MASP-2 является эффекторным компонентом лектинового пути.

Рекомбинантный MASP-2 восстанавливает зависимость от лектинового пути активацию С4 в сыворотке от мышей MASP-2-/-.

Чтобы определить, что отсутствие MASP-2 являлось непосредственной причиной потери зависимости от лектинового пути активации С4 у мышей MASP-2-/-, эффект добавления рекомбинантного белка MASP-2 в образцы сыворотки исследовали в анализе расщепления С4, описанном выше. Функционально активный мышинный MASP-2 и каталитически неактивный мышинный MASP-2А (в котором активный участок остатка серина в домене сериновой протеазы заменен остатком аланина) рекомбинантные белки получены и очищены, как описано ниже в примере 3. Пулированную сыворотку от 4 мышей MASP-2-/- предварительно инкубировали с увеличивающимися концентрациями рекомбинантного мышинового MASP-2 или неактивного рекомбинантного мышинового MASP-2А, и активность конвертазы С4 оценивали, как описано выше.

Результаты: Как показано на фиг. 6, добавление функционально активного мышинового рекомбинантного белка MASP-2 (показано незакрашенными треугольниками) в сыворотку, полученную от мышей MASP-2-/-, восстанавливало зависимость от лектинового пути активацию С4 зависимым от концентрации белка образом, в то время как каталитически неактивный мышинный белок MASP-2А (показано звездочками) не восстанавливал активацию С4. Результаты, показанные на фиг. 6, нормализованы по активации С4, наблюдаемой в пулированной сыворотке от мышей дикого типа (показано пунктирной линией).

Пример 3.

В этом примере описана рекомбинантная экспрессия и продукция белка для рекомбинантного полноразмерного человеческого, крысиного и мышинового MASP-2, происходящих из MASP-2 полипептидов и каталитически неактивных мутантных форм MASP-2.

Экспрессия полноразмерного человеческого, мышинового и крысиного MASP-2.

Полноразмерную последовательность кДНК человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 4) также субклонировали в экспрессирующий вектор для млекопитающих pCI Neo (Promega), который управляет эукариотической экспрессией под контролем энхансерной/промоторной области CMV (описанный в Kaufman R.J. et al., *Nucleic Acids Research* 19:4485 90, 1991; Kaufman, *Methods in Enzymology*, 185:537 66 (1991)). Каждую из полноразмерных мышинной кДНК (SEQ ID NO: 50) и крысиной кДНК (SEQ ID NO: 53) MASP-2 субклонировали в экспрессирующий вектор pED. Затем экспрессирующими MASP-2 векторами трансфицировали адгерентную линию клеток яичника китайского хомяка DXB1 с использованием стандартного способа трансфекции с фосфатом кальция, описанного в Maniatis et al., 1989. Клетки, трансфицированные этими конструкциями, росли очень медленно, что объясняется цитотоксичностью кодируемой протеазы.

По другому способу, конструкцией минигена (SEQ ID NO: 49), содержащей кДНК MASP-2 человека, управляемую ее эндогенным промотором, временно трансфицировали клетки яичника китайского хомяка (CHO). Человеческий белок MASP-2 секретруется в культуральную среду, и его выделяют, как описано ниже.

Экспрессия полноразмерного каталитически неактивного MASP-2.

Обоснование: MASP-2 активируется посредством аутокаталитического расщепления после того, как узнающие субкомпоненты MBL или фиколины (L-фиколин, H-фиколин или M-фиколин) связываются с соответствующими им углеводными паттернами. Аутокаталитическое расщепление, приводящее к активации MASP-2, часто происходит во время процедуры выделения MASP-2 из сыворотки, или во время очистки после рекомбинантной экспрессии. Для получения более стабильного препарата белка для использования в качестве антигена, получена каталитически неактивная форма MASP-2, обозначенная как MASP-2А, посредством замены остатка серина, который присутствует в каталитической триаде домена протеазы, на остаток аланина у крысы (SEQ ID NO: 55, Ser617 на Ala617); у мыши (SEQ ID NO: 52, Ser617 на Ala617); или у человека (SEQ ID NO: 3, Ser618 на Ala618).

Для получения каталитически неактивных человеческих и мышинных белков MASP-2А, проводили сайт-направленный мутагенез с использованием олигонуклеотидов, показанных в табл. 6.

Олигонуклеотиды в табл. 6 разработаны для гибридизации с областью в человеческой и мышинной кДНК, кодирующей ферментативно активный серин, и олигонуклеотид содержит несовпадение для замены кодона серина на кодон аланина. Например, олигонуклеотиды для ПЦП SEQ ID NO: 56-59 использовали в комбинации с кДНК MASP-2 человека (SEQ ID NO: 4) для амплификации области от иницирующего кодона до ферментативно активного серина и от серина до стоп-кодона для получения полного

открытой рамки считывания мутантного MASP-2A, содержащего мутацию Ser618 до Ala618. Продукты ПЦР очищали после электрофореза в агарозном геле и получения полосы, и перекрывание одиночного аденозина получали с использованием стандартного способа получения хвостов. Затем снабженный аденозиновым хвостом MASP-2A клонировали в вектор pGEM T easy, трансформировали в *E. coli*.

Каталитически неактивный крысиный белок MASP-2A получали посредством обработки киназой и гибридизации SEQ ID NO: 64 и SEQ ID NO: 65 посредством объединения этих двух олигонуклеотидов в эквивалентных молярных количествах, нагрева при 100°C в течение 2 минут и медленного охлаждения до комнатной температуры. Полученный в результате гибридизации фрагмент имел совместимые концы для PstI и XbaI, и был вставлен вместо фрагмента PstI-XbaI кДНК MASP-2 крысы дикого типа (SEQ ID NO: 53) для получения крысиного MASP-2A.

5 'GAGGTGACGCAGGAGGGGCATTAGTGTTT 3' (SEQ ID NO: 64)

5' CTAGAAACACTAATGCCCTCCTGCGTCACCTCTGCA 3' (SEQ ID NO: 65)

Каждый из человеческого, мышинного и крысиного MASP-2A далее субклонировали в экспрессирующие векторы для млекопитающих pED или pCI Neo, и трансфицировали в линию клеток яичника китайского хомяка DXB1, как описано ниже.

В другом способе, каталитически неактивную форму MASP-2 конструировали с использованием способа, описанного в Chen et al., *J. Biol. Chem.*, 276(28):25894-25902, 2001. Кратко, плазмиду, содержащую полноразмерную кДНК MASP-2 человека (описанную в Thiel et al., *Nature* 386:506, 1997), расщепляли с использованием XhoI и EcoRI, и кДНК MASP-2 (описанную в настоящем описании как SEQ ID NO: 4) клонировали в соответствующие участки рестрикции бакуловирусного вектора для переноса pFastBac1 (Life Technologies, NY). Затем активный участок сериновой протеазы MASP-2 в Ser618 изменяли на Ala618 посредством замены области нативных аминокислот 610-625 с использованием двухцепочечных олигонуклеотидов, кодирующих область аминокислот пептида 610-625 (SEQ ID NO: 13), для получения полноразмерного полипептида MASP-2 с неактивным протеазным доменом. Конструирование экспрессирующих плазмид, содержащих полипептидные области, происходящие из человеческого MASP-2.

Следующие конструкции получают с использованием сигнального пептида MASP-2 (остатки 1-15 из SEQ ID NO: 5) для секреции различных доменов MASP-2. Конструкцию, экспрессирующую домен CUB1 человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 8) получают посредством амплификации ПЦР области, кодирующей остаток 1-121 MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (соответствующей N-концевому домену CUB1). Конструкцию, экспрессирующую домен CUB1EGF человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 9), получают посредством амплификации ПЦР области, кодирующей остаток 1-166 MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (соответствующей N-концевому домену CUB1EGF). Конструкцию, экспрессирующую домен CUB1EGFCUBII человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 10), получают посредством амплификации ПЦР области, кодирующей остаток 1-293 MASP-2 (SEQ ID NO: 6) (соответствующей N-концевому домену CUB1EGFCUBII). Вышеупомянутые домены амплифицируют посредством ПЦР с использованием полимеразы VentR и pBS-MASP-2 в качестве матрицы, в соответствии с разработанными способами ПЦР.

Последовательность 5'-праймера для смыслового праймера (5' - CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCCTC-3', SEQ ID NO: 34) вводит участок рестрикции BamHI (подчеркнут) на 5'-конце продукта ПЦР. Антисмысловые праймеры для каждого из доменов MASP-2, показанные ниже в табл. 6, разработаны для введения стоп-кодона (полужирный шрифт), за которым следует участок EcoRI (подчеркнут) на конце каждого продукта ПЦР. После амплификации фрагменты ДНК расщепляют с использованием BamHI и EcoRI, и клонируют в соответствующие участки вектора pFastBac1. Полученные в результате конструкции характеризуют посредством рестрикционного картирования и подтверждают посредством секвенирования дцДНК.

Таблица 6  
 Праймеры для ПЦР MASP-2

домен MASP-2	5'-праймер для ПЦР	3'-праймер для ПЦР
SEQ ID NO:8, CUBI (ак 1-121 из SEQ ID NO:6)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGGCTGCATA (SEQ ID NO:35)
SEQ ID NO:9, CUBIEGF (ак 1-166 из SEQ ID NO:6)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTACAGGGCGCT-3' (SEQ ID NO:36)
SEQ ID NO:10, CUBIEGFCUBII (ак 1-293 из SEQ ID NO:6)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGTAGTGGAT-3' (SEQ ID NO:37)
SEQ ID NO:4, MASP-2 человека	5'ATGAGGCTGCTGACCCTCTGGCCTTC-3' (SEQ ID NO: 56) hMASP-2 прямой	5'ТТАААТСТААТТАТГТТСТСГАТС 3' (SEQ ID NO: 59) hMASP-2_обратный
SEQ ID NO:4, κДНК MASP-2 человека	5'CAGAGGTGACGCAGGAGGGGCAC 3' (SEQ ID NO: 58) hMASP-2 ala прямой	5'GTGCCCTCCTGCGTCACCTCTG 3' (SEQ ID NO: 57) hMASP-2_ala_обратный
SEQ ID NO:50 κДНК MASP-2 мыши	5'ATGAGGCTACTCATCTTCTGG3' (SEQ ID NO: 60) mMASP-2 прямой	5'ТТАГАААТТАСТТАТТАТГТТСТСААТСС3' (SEQ ID NO: 63) mMASP-2_обратный
SEQ ID NO:50 κДНК MASP-2 мыши	5'CCCCCCCTGCGTCACCTCTGCAG3' (SEQ ID NO: 62) mMASP-2 ala прямой	5'CTGCAGAGGTGACGCAGGGGGGG-3' (SEQ ID NO: 61) mMASP-2_ala_обратный

Рекомбинантная эукариотическая экспрессия MASP-2 и получение ферментативно неактивных белков мышиного, крысиного и человеческого MASP-2A.

Экспрессирующим MASP-2 и MASP-2A конструкциями, описанными выше, трансфицировали клетки DXB1 с использованием стандартного способа кальций-фосфатной трансфекции (Maniatis et al., 1989). MASP-2A получали в бессывороточной среде, чтобы исключить контаминацию препаратов другими сывороточными белками. Среду собирали с конфлюэнтных клеток каждые вторые сутки (всего четыре раза). Средний уровень рекомбинантного MASP-2A составлял приблизительно 1,5 мг/литр культуральной среды для каждого из трех видов.

Очистка белка MASP-2A: MASP-2A (мутант Ser-Ala, описанный выше) очищали посредством аффинной хроматографии на колонках с агарозой MBP-A. Этот способ позволяет быструю очистку без использования внешних меток. MASP-2A (100-200 мл среды, разведенной в равном объеме буфера для нанесения (50 mM Трис-Cl, pH 7,5, содержащего 150 mM NaCl и 25 mM CaCl<sub>2</sub>), наносили на аффинную колонку с MBP-агарозой (4 мл), предварительно уравновешенную с использованием 10 мл буфера для нанесения. После промывки с использованием следующих 10 мл буфера для нанесения, белок элюировали в 1 мл фракциях с использованием 50 mM Трис Cl, pH 7,5, содержащего 1,25 M NaCl и 10 mM ЭДТА. Фракции, содержащие MASP-2A, идентифицировали посредством электрофореза в полиакриламидном геле с SDS. При необходимости, MASP-2A дополнительно очищали посредством ионообменной хроматографии на колонке MonoQ (HR 5/5). Белок диализовали с использованием 50 mM Трис-Cl pH 7,5, содержащего 50 mM NaCl, и наносили на колонку, уравновешенную тем же буфером. После промывки, связанный MASP-2A элюировали с использованием градиента 0,05-1 M NaCl в 10 мл.

Результаты: Получали выходы 0,25-0,5 мг белка MASP-2A из 200 мл среды. Молекулярная масса 77,5 кДа, определенные посредством MALDI-MS, превышает расчетное значение для немодифицированного полипептида (73,5 кДа) из-за гликозилирования. Присоединение гликанов к каждому из участков N-гликозилирования объясняет наблюдаемую массу. MASP-2A мигрирует в форме одиночной полосы в SDS-полиакриламидных гелях, что показывает, что он не подвергается протеолитическому процессингу в ходе биосинтеза. Средневзвешенная молекулярная масса, определенная посредством равновесного ультрацентрифугирования, согласуется с расчетным значением для гомодимеров гликозилированного полипептида.

Получение рекомбинантных полипептидов MASP-2 человека.

Другой способ получения рекомбинантных полипептидов, происходящих из MASP-2 и MASP2A,

описан в Thielens, N.M., et al., J. Immunol. 166:5068-5077, 2001. Кратко, клетки насекомого *Spodoptera frugiperda* (клетки Ready Plaque Sf9, полученные от Novagen, Madison, WI) выращивают и поддерживают в бессывороточной среде Sf900II (Life Technologies), дополненной 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина (Life Technologies). Клетки насекомого *Trichoplusia ni* (High Five) (полученные от Jadwiga Chroboczek, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France) поддерживали в среде TC100 (Life Technologies), содержащей 10% FCS (Dominique Dutscher, Brumath, France), дополненной 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина. Рекombинантные бакуловirusы получали с использованием системы Bac-to-Bac (Life Technologies). Бакмидную ДНК очищали с использованием системы очистки Qiagen midiprep (Qiagen) и использовали для трансфекции клеток насекомых Sf9 с использованием целфектина в среде Sf900 II SFM (Life Technologies), как описано в протоколе производителя. Рекombинантные вирусные частицы собирают через 4 суток, титруют посредством анализа вирусных бляшек и амплифицируют, как описано в King and Possee, in The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, Chapman and Hall Ltd., London, pp. 111-114, 1992.

Клетки Five ( $1,75 \times 10^7$  клеток/175 см<sup>2</sup> культуральный флакон) инфицируют рекombинантными вирусами, содержащими полипептиды MASP-2 при множественности инфекции 2 в среде Sf900 II SFM при 28°C в течение 96 ч. Супернатанты собирают посредством центрифугирования и добавляют диизопропилфосфорофлуоридат до конечной концентрации 1 мМ.

Полипептиды MASP-2 секретируются в культуральную среду. Культуральные супернатанты подвергают диализу против 50 мМ NaCl, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 50 мМ гидрохлорида триэтанолamina, pH 8,1, и наносят при 1,5 мл/мин на колонку Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) (2,8×12 см), уравновешенную тем же буфером. Элюцию проводили посредством применения 1,2 литров линейного градиента до 350 мМ NaCl в этом же буфере. Фракции, содержащие рекombинантные полипептиды MASP-2, идентифицируют посредством анализа вестерн-блоттинга, преципитировали посредством добавления (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до 60% (мас./об.) и оставляли на ночь при 4°C. Осадки ресуспендируют в 145 мМ NaCl, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 50 мМ гидрохлориде триэтанолamina, pH 7,4, и наносят на колонку TSK G3000 SWG (7,5×600 мм) (Tosohaas, Montgomeryville, PA), уравновешенную тем же буфером. Затем очищенные полипептиды концентрируют до 0,3 мг/мл посредством ультрафильтрации в микроконцентраторах Microsep (порог отсеивания m.w.=10000) (Filtron, Karlstein, Germany).

#### Пример 4.

В этом примере описан способ получения поликлональных антител против полипептидов MASP-2.

#### Материалы и способы.

Антигены MASP-2. Поликлональную антисыворотку против MASP-2 человека получают посредством иммунизации кроликов следующими выделенными полипептидами MASP-2: человеческим MASP-2 (SEQ ID NO: 6), выделенным из сыворотки; рекombинантным человеческим MASP-2 (SEQ ID NO: 6), MASP-2A, содержащим неактивный домен протеазы (SEQ ID NO: 13), как описано в примере 3; и рекombинантными CUBI (SEQ ID NO: 8), CUBEGFI (SEQ ID NO: 9) и CUBEGFCUBII (SEQ ID NO: 10), экспрессированными, как описано выше в примере 3.

Поликлональные антитела: Кроликов в возрасте шести недель, примированных с использованием BCG (вакцины из бациллы Кальметта-Герена) иммунизировали посредством инъекции 100 мкг полипептида MASP-2 при 100 мкг/мл в стерильном солевом растворе. Инъекции проводили каждые 4 недели, с мониторингом титра антител посредством анализа ELISA, как описано в примере 5. Культуральные супернатанты собирают для очистки антител посредством аффинной хроматографии с белком А.

#### Пример 5.

В этом примере описан способ получения мышинных моноклональных антител против полипептидов MASP-2 крысы или человека.

#### Материалы и способы.

Самцам мышей A/J (Harlan, Houston, Tex.), в возрасте 8-12 недель, инъецируют подкожно 100 мкг человеческих или крысиных полипептидов гMASP-2 или гMASP-2A (полученных, как описано в примере 3) в полном адьюванте Фрейнда (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) в 200 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) pH 7,4. С двухнедельными интервалами мышам дважды инъецируют подкожно 50 мкг человеческого или крысиного полипептида гMASP-2 или гMASP-2A в неполном адьюванте Фрейнда. На четвертой неделе мышам инъецируют 50 мкг человеческого или крысиного полипептида гMASP-2 или гMASP-2A в PBS, и слияние проводят через 4 суток.

Для каждого слияния, получают суспензии отдельных клеток селезенки иммунизированной мыши и используют для слияния с клетками миеломы Sp2/0.  $5 \times 10^8$  клеток Sp2/0 и  $5 \times 10^8$  клеток селезенки подвергают слиянию в среде, содержащей 50% полиэтиленгликоль (M.W. 1450) (Kodak, Rochester, N.Y.) и 5% диметилсульфоксид (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Затем концентрацию клеток селезенки доводят до  $1,5 \times 10^5$  клеток селезенки на 200 мкл суспензии в среде Iscove (Gibco, Grand Island, N.Y.), дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой, 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 0,1 мМ гипоксантина, 0,4 мкМ аминоксантина и 16 мкМ тимидина. Двести микролитров суспензии клеток добавляют в каждую лунку из приблизительно двадцати 96-луночных микропланшетов. Через прибли-

тельно десять суток культуральные супернатанты отбирают для скрининга по реакционной способности по отношению к очищенному фактору MASP-2 в анализе ELISA.

Анализ ELISA. Лунки микропланшетов Immulon 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.) покрывают посредством добавления 50 мкл очищенного hMASP-2 при 50 нг/мл или гMASP-2 (или гMASP-2A) крысы в течение ночи при комнатной температуре. Низкая концентрация MASP-2 для покрытия позволяет отбор высокоаффинных антител. После удаления покрывающего раствора посредством постукивания планшетов, 200 мкл BLOTTO (обезжиренного сухого молока) в PBS добавляют в каждую лунку на один час для блокирования неспецифических участков. Через один час, лунки затем промывают буфером PBST (PBS, содержащим 0,05% Tween 20). Пятьдесят микролитров культуральных супернатантов из каждой лунки после слияния собирают и смешивают с 50 мкл BLOTTO, и затем добавляют в индивидуальные лунки микропланшетов. После одного часа инкубации, лунки промывают PBST. Связанные мышинные антитела затем детектируют посредством реакции с антителом козы против IgG мыши (специфическим для Fc), конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.) и разведенным до 1:2000 в BLOTTO. Раствор субстрата пероксидазы, содержащий 0,1% 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (Sigma, St. Louis, Mo.) и 0,0003% пероксид водорода (Sigma), добавляют в лунки для проявления окрашивания в течение 30 минут. Реакцию останавливают посредством добавления 50 мкл 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> на лунку. Оптическую плотность реакционной смеси при 450 нм считывали с использованием считывателя BioTek ELISA Reader (BioTek Instruments, Winooski, Vt.).

Анализ связывания MASP-2.

Культуральные супернатанты с положительным тестом в анализе ELISA MASP-2, описанном выше, можно тестировать в анализе связывания для определения аффинности связывания, которую ингибирующие MASP-2 средства имеют для MASP-2. Сходный анализ можно использовать для определения того, связываются ли ингибирующие средства с другими антигенами в системе комплемента.

Лунки полистирольного 96-луночного микропланшета для титрования (96-well medium binding plates, Corning Costar, Cambridge, MA) покрывают с использованием MASP-2 (20 нг/100 мкл/лунку, Advanced Research Technology, San Diego, CA) в фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7,4, в течение ночи при 4°C. После удаления раствора MASP-2, лунки блокируют с использованием PBS, содержащего 1% бычий сывороточный альбумин (BSA; Sigma Chemical) в течение 2 ч при комнатной температуре. Лунки без покрытия MASP-2 служат в качестве фонового контроля. Аликвоты супернатантов гибридомы или очищенных МоАб против MASP-2, в различных концентрациях в блокирующем растворе, добавляют в лунки. После инкубации в течение 2 ч при комнатной температуре, лунки интенсивно промывают PBS. Связанное с MASP-2 МоАб против MASP-2 детектируют посредством добавления антитела козы против IgG мыши, конъюгированного с пероксидазой (Sigma Chemical) блокирующем растворе, который инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет снова тщательно промывают PBS, и добавляют 100 мкл субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Реакцию TMB останавливают посредством добавления 100 мкл 1M фосфорной кислоты, и планшет считывают при 450 нм в считывателе для микропланшетов (SPECTRA MAX 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Культуральные супернатанты из положительных лунок затем тестируют по способности ингибировать активацию комплемента в функциональном анализе, таком как анализ расщепления C4, как описано в примере 2. Затем клетки из положительных лунок клонируют способом предельного разведения. МоАб снова тестируют по реакционной способности по отношению к hMASP-2 в анализе ELISA, как описано выше. Отобранные гибридомы выращивают во флаконах с перемешиванием, и истощенный культуральный супернатант собирают для очистки антитела посредством аффинной хроматографии с белком А.

Пример 6.

В этом примере описаны получение и продукция гуманизированных мышинных антител и фрагментов антител против MASP-2.

Мышиное моноклональное антитело против MASP-2 получают от самца мыши A/J, как описано в примере 5. Затем мышинное антитело гуманизируют, как описано ниже, для уменьшения его иммуногенности посредством замены мышинных константных областей их человеческими аналогами для получения химерного антитела IgG и фрагмента Fab антитела, которые можно использовать для ингибирования неблагоприятных эффектов зависимой от MASP-2 активации комплемента у пациента, который является человеком, по настоящему изобретению.

1. Клонирование генов переменных областей антител против MASP-2 из клеток мышинной гибридомы. Тотальную РНК выделяют из клеток гибридомы, секретирующих МоАб против MASP-2 (полученное, как описано в примере 7) с использованием RNazol, следуя протоколу производителя (Biotech, Houston, Tex.). Первую цепь кДНК синтезируют на основе тотальной РНК с использованием олиго -dT в качестве праймера. ПЦР проводят с использованием 3' праймеров, выведенных из константной С-области иммуноглобулина, и наборов выродженных праймеров, выведенных из лидерного пептида или первой каркасной области мышинных генов V<sub>H</sub> или V<sub>K</sub>, в качестве 5'-праймеров. Заякоренную ПЦР осуществляют, как описано в Chen and Platsucas (Chen, P.F., Scand. J. Immunol. 35:539-549, 1992). Для клонирования гена V<sub>K</sub>, двухцепочечную кДНК получают с использованием праймера Not1-MAK1 (5'-



TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGTCTTT-3' SEQ ID NO: 38). Гибридизационные адаптеры AD1 (5'-GGAATTCACCTCGTTATTCTCGGA-3' SEQ ID NO: 39) и AD2 (5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SEQ ID NO: 40) лигируют к обоим 5'- и 3'-концам двухцепочечной кДНК. Адаптеры на 3'-концах удаляют посредством расщепления NotI. Затем продукт расщепления используют в качестве матрицы в ПЦР с олигонуклеотидом AD1 в качестве 5'-праймера и МАК2 (5'-CATTGAAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTTC-3' SEQ ID NO: 41) в качестве 3'-праймера. Фрагменты ДНК приблизительно по 500 п.о., клонируют в pUC19. Несколько клонов выбирают для анализа последовательности с целью подтверждения того, что клонированная последовательность охватывает ожидаемую константную область мышинового иммуноглобулина. Олигонуклеотиды NotI-МАК1 и МАК2 получены из области V<sub>к</sub> и расположены на 182 и 84 паре оснований, соответственно, ниже от первой пары оснований гена С каппа. Отбирают клоны, содержащие полную размерную V<sub>к</sub> и лидерный пептид.

Для клонирования гена V<sub>н</sub>, двухцепочечную кДНК получают с использованием праймера NotI MAG1 (5'-CGCGCCCGCAGCTGCTCAGAGTGTAGA-3' SEQ ID NO: 42). Гибридизационные адаптеры AD1 и AD2 лигируют к обоим 5'- и 3'-концам двухцепочечной кДНК. Адаптеры на 3'-концах удаляют посредством расщепления NotI. Продукт расщепления используют в качестве матрицы в ПЦР с олигонуклеотидом AD1 и MAG2 (5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGGAAATA-3' SEQ ID NO: 43) в качестве праймеров. Фрагменты ДНК длиной 500-600 п.о. клонируют в pUC19. Олигонуклеотиды NotI MAG1 и MAG2 выведены из мышиноной области С<sub>γ</sub>.7.1, и расположены на 180 и 93 п.о., соответственно, ниже первой п.о. мышиноной гена С<sub>γ</sub>.7.1. Отбирают клоны, содержащие полную размерную V<sub>н</sub> и лидерный пептид.

2. Конструирование экспрессирующих векторов для химерных IgG и Fab против MASP-2. Клонированные гены V<sub>н</sub> и V<sub>к</sub>, описанные выше, используют в качестве матриц в реакции ПЦР для добавления консенсусной последовательности Козака к 5'-концу и донора для сплайсинга к 3'-концу нуклеотидной последовательности. После анализа последовательностей для подтверждения отсутствия ошибок ПЦР, гены V<sub>н</sub> и V<sub>к</sub> вставляют в кассеты экспрессирующих векторов, содержащих человеческие С<sub>γ</sub>1 и С. каппа, соответственно, с получением pSV2neoV<sub>н</sub> huС<sub>γ</sub>1 и pSV2neoV huС<sub>γ</sub>. Очищенные в градиенте CsCl плазмидные ДНК векторов для тяжелой и легкой цепи используют для трансфекции клеток COS посредством электропорации. Через 48 часов, культуральный супернатант тестируют посредством ELISA для подтверждения наличия приблизительно 200 нг/мл химерного IgG. Клетки собирают и получают тотальную РНК. Первую цепь кДНК синтезируют на основе тотальной РНК с использованием олиго -dT в качестве праймера. Эту кДНК используют в качестве матрицы для ПЦР для получения фрагментов ДНК Fd и каппа. Для гена Fd, ПЦР проводят с использованием 5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAАСТ-3' (SEQ ID NO: 44) в качестве 5'-праймера и выведенного из СН1 3'-праймера (5'-CGGGATCCTCAAАСТТТСТТGTCCACСТТGG-3' SEQ ID NO: 45). Подтверждают, что последовательность ДНК содержит полные V<sub>н</sub> и домен СН1 человеческого IgG1. После расщепления соответствующими ферментами, фрагменты ДНК Fd вставляют в участки рестрикции HindIII и BamHI кассеты экспрессирующей векторной кассеты pSV2dhfr TUS для получения pSV2dhfrFd. Плазмида pSV2 является коммерчески доступной и состоит из фрагментов ДНК из различных источников: ДНК pBR322 (тонкая линия) содержит точку начала репликации ДНК pBR322 (pBR ori) и ген лактамазы для устойчивости к ампициллину (Amp); ДНК SV40, представленная более широкими штрихами и маркировкой, содержит точку начала репликации ДНК SV40 (SV40 ori), ранний промотор (5' от генов dhfr и neo), и сигнал полиаденилирования (3' от генов dhfr и neo). Происходящий из SV40 сигнал полиаденилирования (pA) также помещен на 3'-конец гена Fd.

Для гена каппа, ПЦР проводят с использованием 5'-AAGAAAGCTTGCCGCCACCATGTTCTCACTAGCTCT-3' (SEQ ID NO: 46) в качестве 5'-праймера и выведенного из С<sub>к</sub> 3'-праймера (5'-CGGGATCCTTCTCCCTCTAАCACTCT-3' SEQ ID NO: 47). Подтверждено, что последовательность ДНК содержит полную размерные человеческие области V<sub>к</sub> и С<sub>к</sub>. После расщепления соответствующими ферментами рестрикции, фрагменты ДНК каппа вставляют в участки рестрикции HindIII и BamHI экспрессирующей векторной кассеты pSV2neo TUS для получения pSV2neoK. Экспрессией генов Fd и каппа управляют посредством происходящих из HCMV энхансерных и промоторных элементов. Поскольку ген Fd не включает остаток цистеиновой аминокислоты, вовлеченный в межцепевую дисульфидную связь, этот рекомбинантный химерный Fab содержит не связанные ковалентно тяжелые и легкие цепи. Этот химерный Fab обозначен как cFab.

Для получения рекомбинантного Fab с дисульфидной связью между тяжелой и легкой цепями, вышеуказанный ген Fd может быть расширен для включения последовательности, кодирующей 9 дополнительных аминокислот (EPKSCDKTH, SEQ ID NO: 48) из шарнирной области человеческого IgG1. Фрагмент ДНК BstEII-BamHI, кодирующий 30 аминокислот на 3'-конце гена Fd, можно заменять на фрагменты ДНК, кодирующие расширенный Fd, получая в результате pSV2dhfrFd/9aa.

### 3. Экспрессия и очистка химерного IgG против MASP-2.

Для получения линий клеток, секретирующих химерное IgG против MASP-2, клетки NSO трансфицируют с использованием плазмидных ДНК pSV2neoV<sub>н</sub> huС<sub>γ</sub>1 и pSV2neoV huС каппа посредством электропорации. Трансфицированные клетки отбирают в присутствии 0,7 мг/мл G418. Клетки выращи-

вают в 250 мл колбе с перемешиванием с использованием содержащей сыворотку среды.

Культуральный супернатант из 100 мл культуры из колбы с перемешиванием наносят на 10 мл колонку PROSEP A (Bioprocessing, Inc., Princeton, N.J.). Колонку промывают 10 объемами слоя PBS. Связанное антитело элюируют с использованием 50 мМ цитратного буфера, pH 3,0. Равный объем 1 М Нерес, pH 8,0, добавляют к фракции, содержащей очищенное антитело, для доведения pH до 7,0. Остаточные соли удаляют посредством замены буфера на PBS посредством ультрафильтрации с мембраной Millipore (порог отсека M.W.: 3000). Концентрацию белка очищенного антитела определяют способом BCA (Pierce).

#### 4. Экспрессия и очистка химерного Fab против MASP-2.

Для получения линий клеток, секретирующих химерные Fab против MASP-2, клетки CHO трансфицируют очищенными плазмидными ДНК pSV2dhfrFd (или pSV2dhfrFd/9aa) и pSV2neoкарпа, посредством электропорации. Трансфицированные клетки отбирают в присутствии G418 и метотрексата. Отобранные линии клеток размножают при увеличивающихся концентрациях метотрексата. Клетки представляют собой отдельные клетки, субклонированные посредством предельного разведения. Затем субклонированные линии клеток с высокой продукцией выращивают в 100 мл культуры в колбе с перемешиванием с использованием бессывороточной среды.

Химерный Fab против MASP-2 очищают посредством аффинной хроматографии с использованием мышинового анти-идиотипического МоАб к МоАб против MASP-2. Анти-идиотипическое антитело к МоАб против MASP-2 можно получать посредством иммунизации мышей мышинным МоАб против MASP-2, конъюгированным с гемоцианином морского блюдечка (KLH) и скрининга по специфическому связыванию МоАб, с которым может конкурировать человеческий MASP-2. Для очистки, 100 мл супернатанта из культур в колбе с перемешиванием клеток CHO, продуцирующих cFab или cFab/9aa, наносят на аффинную колонку с присоединенным антиидиотипическим антителом к МоАб против MASP-2. Затем колонку тщательно промывают с использованием PBS до элюции связанного Fab с использованием 50 мМ диэтиламина, pH 11,5. Остаточные соли удаляют посредством замены буфера, как описано выше. Концентрацию белка очищенного Fab определяют способом BCA (Pierce).

Способность химерных MASP-2 IgG, cFab, и cFab/9aa ингибировать зависимые от MASP-2 пути комплемента можно определять с использованием анализов ингибирования, описанного в примере 2 или примере 7.

#### Пример 7.

В этом примере описан анализ расщепления C4 *in vitro*, используемый в качестве функционального скрининга для идентификации ингибирующих MASP-2 средств, способных блокировать зависимую от MASP-2 активацию комплемента посредством L-фиколина/P35, H-фиколина, M-фиколина или маннана.

Анализ расщепления C4. В Petersen, S.V., et al., J. Immunol. Methods 257:107, 2001, описан анализ расщепления C4, в котором измеряют активацию лектинового пути, вызванную липотейхоевой кислотой (LTA) из *S. aureus*, которая связывает L-фиколин.

Реагенты: Фиксированный формалином *S. aureus* (DSM20233) получают следующим образом: бактерии выращивают в течение ночи при 37°C в триптон-соевой кровяной среде, промывают три раза с использованием PBS, затем фиксируют в течение 1 ч при комнатной температуре в PBS/0,5% формалине, и промывают еще три раза с использованием PBS, перед ресуспендированием в покрывающем буфере (15 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 мМ NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6).

Анализ. Лунки микропланшета для титрования Nunc MaxiSorb (Nalgene Nunc International, Rochester, NY) покрывают с использованием: 100 мкл фиксированного формалином *S. aureus* DSM20233 (OD<sub>550</sub>=0/5) в покрывающем буфере с 1 мкг L-фиколина в покрывающем буфере. После инкубации в течение ночи, лунки блокируют с использованием 0,1% человеческого сывороточного альбумина (HSA) в TBS (10 мМ Трис HCl, 140 мМ NaCl, pH 7,4), затем промывают с использованием TBS, содержащего 0,05% Tween 20 и 5 мМ CaCl<sub>2</sub> (wash буфер). Образцы человеческой сыворотки разводят в 20 мМ Трис HCl, 1 М NaCl, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,05% Triton X 100, 0,1% HSA, pH 7,4, которые предотвращают активацию эндогенного C4 и вызывают диссоциацию комплекса C1 (состоящего из C1q, C1r и C1s). Ингибирующие MASP-2 средства, включая МоАб против MASP-2 и ингибирующие пептиды, добавляют к образцам сыворотки в различных концентрациях. Разведенные образцы добавляют в планшет и инкубируют в течение ночи при 4°C. Через 24 ч планшеты тщательно промывают буфером для промывки, затем 0,1 мкг очищенного человеческого C4 (полученного, как описано в Dodds, A.W., Methods Enzymol. 223:46, 1993) в 100 мкл 4 мМ барбитала, 145 мМ NaCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4 добавляют в каждую лунку. Через 1,5 ч при 37°C, планшеты снова промывают, и накопление C4b детектируют с использованием конъюгированного с щелочной фосфатазой куриного антитела против C4с человека (полученного из Immunsystem, Uppsala, Sweden) и измеряют с использованием колориметрического субстрата п-нитрофенилфосфата.

Анализ C4 на маннани. Вышеописанный анализ адаптирован для измерения активации лектинового пути с использованием MBL посредством покрытия планшета LSP и маннаном перед добавлением сыворотки, смешанной с различными ингибирующими MASP-2 средствами.

Анализ C4 на фиколине H (Hakata Ag): Вышеописанный анализ адаптирован для измерения актива-

ции лектинового пути с использованием Н-фиколина посредством покрытия планшета LPS и фиколином Н перед добавлением сыворотки, смешанной с различными ингибирующими MASP-2 средствами.

Пример 8.

Следующий анализ демонстрирует наличие активации классического пути у мышей дикого типа и мышей MASP-2<sup>-/-</sup>.

Способы. Иммуные комплексы получали *in situ* посредством покрытия микропланшетов для титрования (Maxisorb, Nunc, кат. No. 442404, Fisher Scientific) 0,1% человеческим сывороточным альбумином в 10 мМ Трис, 140 мМ NaCl, pH 7,4 в течение 1 ч при комнатной температуре с последующей инкубацией в течение ночи при 4°C с антисывороткой овцы против цельной сыворотки (Scottish Antibody Production Unit, Carluke, Scotland), разведенной 1:1000 в TBS/tween/Ca<sup>2+</sup>. Образцы сыворотки получали от мышей дикого типа и мышей MASP-2<sup>-/-</sup> и добавляли в покрытые планшеты. Получали контрольные образцы, в которых C1q был истощен, из образцов сыворотки дикого типа и MASP-2<sup>-/-</sup>. Истощенную по C1q мышиную сыворотку получали с использованием Dynabeads со связанным белком А (DynaL Biotech, Oslo, Norway), покрытых IgG кролика против C1q человека (Dako, Glostrup, Denmark), в соответствии с инструкциями поставщика. Планшеты инкубировали в течение 90 минут при 37°C. Связанный C3b детектировали с использованием поликлональных антител против C3c человека (Dako A 062), разведенных в TBS/tw/Ca<sup>++</sup> до 1:1000. Вторичное антитело представляет собой антитело козы против IgG кролика.

Результаты. На фиг. 7 показаны относительные уровни накопления C3b на планшетах, покрытых IgG, в сыворотке дикого типа, сыворотке MASP-2<sup>-/-</sup>, сыворотке дикого типа с истощенным C1q и сыворотке MASP-2<sup>-/-</sup> с истощенным C1q. Эти результаты показывают, что классический путь является интактным у мышей линии MASP-2<sup>-/-</sup>.

Пример 9.

Следующий анализ используют для тестирования того, блокирует ли ингибирующее MASP-2 средство классический путь, посредством анализа эффекта ингибирующего MASP-2 средства в условиях, при которых классический путь инициируется посредством иммунных комплексов.

Способы. Для тестирования эффекта ингибирующего MASP-2 средство в условиях активации комплемента, когда классический путь активации инициируется иммунными комплексами, образцы по 50 мкл, содержащие 90% NHS, в трех повторах, инкубируют при 37°C в присутствии 10 мкг/мл иммунного комплекса (IC) или PBS, и параллельно включают также образцы (+/- IC) в трех повторах, которые содержат 200 нМ моноклональное антитело против пропердина, в ходе инкубации при 37°C. После двухчасовой инкубации при 37°C, во все образцы добавляют 13 мМ ЭДТА для остановки дальнейшей активации комплемента, и образцы немедленно охлаждают до 5°C. Затем образцы сохраняют при 70°C до анализа продуктов активации комплемента (C3a и sC5b-9) с использованием наборов для ELISA (Quidel, каталожные No. A015 и A009), следуя инструкциями производителя.

Пример 10.

В этом примере описана идентификация высокоаффинных фрагментов антител Fab2 против MASP-2, блокирующих активность MASP-2.

Уровень техники и обоснование. MASP-2 представляет собой комплексный белок со множеством отдельных функциональных доменов, включая: участок(участки) связывания для MBL и фиколинов, каталитический участок сериновой протеазы, участок связывания для протеолитического субстрата C2, участок связывания для протеолитического субстрата C4, участок расщепления MASP-2 для аутоактивации зимогена MASP-2, и два участка связывания Ca<sup>++</sup>. Идентифицированы фрагменты антител Fab2, связывающиеся с высокой аффинностью с MASP-2, и идентифицированные фрагменты Fab2 тестировали в функциональном анализе для определения того, способны ли они блокировать функциональную активность MASP-2.

Для блокирования функциональной активности MASP-2, антитело или фрагмент антитела Fab2 должны связываться и создавать помехи для структурного эпитопа на MASP-2, необходимого для функциональной активности MASP-2. Таким образом, многие или все высокоаффинные связывающиеся Fab2 против MASP-2 могут не ингибировать функциональную активность MASP-2, если они не связываются со структурными эпитопами на MASP-2, которые непосредственно вовлечены в функциональную активность MASP-2.

Функциональный анализ, в котором измеряют ингибирование образования конвертазы C3 лектинового пути, использовали для оценки "блокирующей активности" Fab2 против MASP-2. Известно, что первичная физиологическая роль MASP-2 в лектиновом пути состоит в получении следующего функционального компонента опосредованного лектином пути комплемента, а именно, конвертазы C3 лектинового пути. Конвертаза C3 лектинового пути представляет собой критический ферментный комплекс (C4bC2a), который протеолитически расщепляет C3 на C3a и C3b. MASP-2 не является структурным компонентом конвертазы C3 лектинового пути (C4bC2a); однако, функциональная активность MASP-2 необходима для получения двух белковых компонентов (C4b, C2a), которые содержит конвертаза C3 лектинового пути. Кроме того, все отдельные виды функциональной активности MASP-2, перечисленные выше, по-видимому, являются необходимыми для MASP-2 для образования конвертазы C3 лектино-

вого пути. По этой причине предпочтительным анализом для использования для оценки "блокирующей активности" Fab2 против MASP-2 считают функциональный анализ, в котором измеряют ингибирование формирования конвертазы C3 лектинового пути.

Получение высокоаффинных Fab2. Библиотеку фагового дисплея переменных последовательностей легких и тяжелых цепей антител человека и технологию автоматизированной селекции антител для идентификации Fab2, которые взаимодействуют с избранными представляющими интерес лигандами, использовали для получения высокоаффинных Fab2 против крысиного белка MASP-2 (SEQ ID NO: 55). Известное количество крысиного белка MASP-2 (~1 мг, чистота >85%) использовали для скрининга антител. Три цикла амплификации использовали для отбора антител с наилучшей аффинностью. Приблизительно 250 различных наилучших кандидатов, экспрессирующих фрагменты антител, отобрали для скрининга ELISA. Кандидаты с высокой аффинностью впоследствии секвенировали для определения уникальности различных антител.

Пятьдесят уникальных антител против MASP-2 были очищены, и 250 мкг каждого очищенного антитела Fab2 использовали для характеристики аффинности связывания MASP-2 и функционального тестирования пути активации комплемента, как более подробно описано ниже.

Анализы, используемые для оценки ингибирующей (блокирующей) активности Fab2 против MASP-2.

#### 1. Анализ для измерения ингибирования формирования конвертазы C3 лектинового пути.

Уровень техники. Конвертаза C3 лектинового пути представляет собой ферментный комплекс (C4bC2a), который протеолитически расщепляет C3 на два активных провоспалительных фрагмента, анафилатоксин C3a и опсонин C3b. Формирование конвертазы C3, по-видимому, является ключевой стадией в лектиновом пути в отношении опосредования воспаления. MASP-2 не является структурным компонентом конвертазы C3 лектинового пути (C4bC2a); таким образом, антитела против MASP-2 (или Fab2) не ингибируют напрямую активность предсуществующей конвертазы C3. Однако активность сериновой протеазы MASP-2 является необходимой для получения двух белковых компонентов (C4b, C2a), которые содержит конвертаза C3 лектинового пути. Таким образом, Fab2 против MASP-2, ингибирующий функциональную активность MASP-2 (т.е., блокирующий Fab2 против MASP-2), ингибирует формирование *de novo* конвертазы C3 лектинового пути. C3 содержит нетипичную и высоко реакционноспособную тиоэфирную группу в качестве части структуры. При расщеплении C3 посредством конвертазы C3 в этом анализе, тиоэфирная группа на C3b может формировать ковалентную связь с гидроксильной группой или аминогруппой на макромолекулах, иммобилизованных на дне пластиковых лунок, посредством сложноэфирных или амидных связей, таким образом, облегчая детекцию C3b в анализе ELISA.

Дрожжевой маннан является известным активатором лектинового пути. В следующем способе для измерения формирования конвертазы C3, пластиковые лунки, покрытые маннаном, инкубировали в течение 30 мин при 37°C с разведенной крысиной сывороткой для активации лектинового пути. Затем лунки промывали и анализировали C3b, иммобилизованный в лунках, посредством стандартных способов ELISA. Количество C3b, образованного в этом анализе, является прямым отражением формирования *de novo* конвертазы C3 лектинового пути. Fab2 против MASP-2 в выбранных концентрациях тестировали в этом анализе по их способности ингибировать формирование конвертазы C3 и последующее образование C3b.

#### Способы.

96-луночные планшеты Costar Medium Binding инкубировали в течение ночи при 5°C с маннаном, разведенном в 50 мМ карбонатном буфере, pH 9,5, при 1 мкг/50 мкл/лунку. После инкубации в течение ночи, каждую лунку промывали три раза с использованием 200 мкл PBS. Затем лунки блокировали с использованием 100 мкл/лунку 1% бычьего сывороточного альбумина в PBS и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с осторожным перемешиванием. Затем каждую лунку промывали три раза с использованием 200 мкл PBS. Образцы Fab2 против MASP-2 разводили до выбранных концентраций в содержащем Ca<sup>++</sup> и Mg<sup>++</sup> буфере GVB (4,0 мМ барбитал, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2,0 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,1% желатин, pH 7,4) при 5°C. 0,5% крысиной сыворотки добавляли в вышеуказанные образцы при 5°C, и 100 мкл переносили в каждую лунку. Планшеты покрывали и инкубировали в течение 30 минут при 37°C в водяной бане для обеспечения активации комплемента. Реакцию останавливали посредством переноса планшетов из водяной бани с температурой 37°C в контейнер, содержащий смесь льда и воды. Каждую лунку промывали пять раз с использованием 200 мкл PBS Tween 20 (0,05% Tween 20 в PBS), затем промывали два раза с использованием 200 мкл PBS. 100 мкл /лунку первичного антитела в разведении 1:10000 (антитела кролика против C3c человека, DAKO A0062) добавляли в PBS, содержащем 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали 1 час при комнатной температуре с осторожным перемешиванием. Каждую лунку промывали 5×200 мкл PBS. 100 мкл /лунку вторичного антитела в разведении 1:10000 (конъюгированного с пероксидазой антитела козы против IgG кролика, American Qualex A102PU) добавляли в PBS, содержащем 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре во встряхивателе с осторожным перемешиванием. Каждую лунку промывали пять раз с использованием 200 мкл PBS. 100 мкл/лунку субстрата пероксидазы TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) добавляли и инкубировали при комнатной температуре в

течение 10 мин. Реакцию пероксидазы останавливали добавлением 100 мкл/лунку 1,0 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , и измеряли  $\text{OD}_{450}$ .

## 2. Анализ для измерения ингибирования зависимо от MASP-2 расщепления C4.

Уровень техники. Активность сериновой протеазы MASP-2 является высоко специфической, и идентифицированы только два белковых субстрата для MASP-2; C2 и C4. Расщепление C4 образует C4a и C4b. Fab2 против MASP-2 может связываться со структурными эпитопами на MASP-2, напрямую вовлеченными в расщепление C4 (например, участок связывания MASP-2 для C4; каталитический участок сериновой протеазы MASP-2), и таким образом, ингибирует функциональную активность MASP-2 для расщепления C4.

Дрожжевой маннан представляет собой известный активатор лектинового пути. В следующем способе для измерения активности MASP-2 расщепления C4, пластиковые лунки, покрытые маннаном, инкубировали в течение 30 минут при 37°C с разведенной крысиной сывороткой для активации лектинового пути. Поскольку первичное антитело, используемое в этом ELISA, узнает только человеческий C4, разведенную крысиную сыворотку дополняли также человеческим C4 (1,0 мкг/мл). Затем лунки промывали и анализировали человеческий C4b, иммобилизованный в лунках, с использованием стандартных способов ELISA. Количество C4b, полученного в этом анализе, является показателем зависимой от MASP-2 активности расщепления C4. Fab2 против MASP-2 в выбранных концентрациях тестировали в этом анализе по их способности ингибировать расщепление C4.

Способы. 96-луночные планшеты Costar Medium Binding инкубировали в течение ночи при 5°C с маннаном, разведенном в 50 мМ карбонатном буфере, pH 9,5, при 1,0 мкг/50 мкл/лунку. Каждую лунку промывали 3X с использованием 200 мкл PBS. Затем лунки блокировали с использованием 100 мкл/лунку 1% бычьего сывороточного альбумина в PBS и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с осторожным перемешиванием. Каждую лунку промывали 3X с использованием 200 мкл PBS. Образцы Fab2 против MASP-2 разводили до выбранных концентраций в содержащем  $\text{Ca}^{++}$  и  $\text{Mg}^{++}$  буфере GVB (4,0 мМ барбитал, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2,0 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0,1% желатин, pH 7,4) при 5°C. 1,0 мкг/мл человеческого C4 (Quidel) также включали в эти образцы. 0,5% крысиную сыворотку добавляли к вышеуказанным образцам при 5°C, и 100 мкл переносили в каждую лунку. Планшеты накрывали и инкубировали в течение 30 мин на водяной бане при 37°C для обеспечения активации комплекса. Реакцию останавливали посредством переноса планшетов из водяной бани с температурой 37°C в контейнер, содержащий смесь льда и воды. Каждую лунку промывали 5×200 мкл PBS Tween 20 (0,05% Tween 20 в PBS), затем каждую лунку промывали 2X с использованием 200 мкл PBS. 100 мкл/лунку конъюгированного с биотином антитела курицы против C4с человека в разведении 1:700 (Immunosystem AB, Uppsala, Sweden) добавляли в PBS, содержащем 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA), и инкубировали один час при комнатной температуре с осторожным перемешиванием. Каждую лунку промывали 5×200 мкл PBS. 100 мкл/лунку 0,1 мкг/мл конъюгированного с пероксидазой стрептавидина (Pierce Chemical #21126) добавляли в PBS, содержащем 2,0 мг/мл BSA, и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре во встряхивателе с осторожным перемешиванием. Каждую лунку промывали 5×200 мкл PBS. 100 мкл /лунку субстрата пероксидазы TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) добавляли и инкубировали при комнатной температуре в течение 16 мин. Реакцию пероксидазы останавливали добавлением 100 мкл/лунку 1,0 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , и измеряли  $\text{OD}_{450}$ .

## 3. Анализ связывания Fab2 против MASP-2 крысы с "нативным" крысиным MASP-2.

Уровень техники. MASP-2 обычно присутствует в плазме в форме диммерного комплекса MASP-2, который включает также специфические лектиновые молекулы (связывающий маннозу белок (MBL) и фиколины). Таким образом, при наличии интереса к исследованию связывания Fab2 против MASP-2 с физиологически значимой формой MASP-2, является важным разработать анализ связывания, в котором используют взаимодействие между Fab2 и "нативным" MASP-2 в плазме, а не очищенным рекомбинантным MASP-2. В этом анализе связывания "нативный" комплекс MASP-2-MBL из 10% крысиной сыворотки сначала иммобилизовали на покрытых маннаном лунках. Затем аффинность связывания различных Fab2 против MASP-2 с иммобилизованным "нативным" MASP-2 исследовали с использованием стандартного способа ELISA.

Способы. 96-луночные планшеты Costar High Binding инкубировали в течение ночи при 5°C с маннаном, разведенном в 50 мМ карбонатном буфере, pH 9,5, при 1 мкг/50 мкл/лунку. Каждую лунку промывали 3X с использованием 200 мкл PBS. лунки блокировали с использованием 100 мкл/лунку 0,5% обезжиренного сухого молока в PBST (PBS с 0,05% Tween 20) и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с осторожным перемешиванием. Каждую лунку промывали 3X с использованием 200 мкл буфера для промывки TBS/Tween/ $\text{Ca}^{++}$  (забуференный Трис солевой раствор, 0,05% Tween 20, содержащий 5,0 мМ  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,4. 10% крысиную сыворотку в связывающем буфере с высоким содержанием солей (20 мМ Трис, 1,0 М NaCl, 10 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0,05% Triton X100, 0,1% (мас./об.) бычьего сывороточного альбумина, pH 7,4) подготавливали на льду. 100 мкл/лунку добавляли и инкубировали в течение ночи при 5°C. Лунки промывали 3X с использованием 200 мкл буфера для промывки TBS/Tween/ $\text{Ca}^{++}$ . Затем лунки промывали 2X с использованием 200 мкл PBS. 100 мкл/лунку Fab2 против

MASP-2 в выбранной концентрации, разведенного в содержащем  $\text{Ca}^{++}$  и  $\text{Mg}^{++}$  буфере GVB (4,0 мМ барбитал, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2,0 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0,1% желатин, pH 7,4) добавляли и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с осторожным перемешиванием. Каждую лунку промывали  $5 \times 200$  мкл PBS. 100 мкл /лунку конъюгированного с HRP антитела козы против Fab2 (Biogenesis, кат. No 0500 0099), разведенного 1:5000 в 2,0 мг/мл бычьего сывороточного альбумина в PBS добавляли и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с осторожным перемешиванием. Каждую лунку промывали  $5 \times 200$  мкл PBS. 100 мкл /лунку субстрата пероксидазы TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) добавляли и инкубировали при комнатной температуре в течение 70 мин. Реакцию пероксидазы останавливали добавлением 100 мкл /лунку 1,0 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , и измеряли  $\text{OD}_{450}$ .

Результаты.

Приблизительно 250 различных Fab2, вступающих в реакцию с высокой аффинностью с белком MASP-2 крысы, отбирали для скрининга ELISA. Эти высокоаффинные Fab2 секвенировали для определения уникальности различных антител, и 50 уникальных антител против MASP-2 очищали для дальнейшего анализа. 250 мкг каждого очищенного антитела Fab2 использовали для характеристики аффинности связывания MASP-2 и функционального тестирования пути комплемента. Результаты этого анализа показаны ниже в табл. 7.

Таблица 7  
FAB2 против MASP-2, блокирующие лектиновый путь активации комплемента

Антитело Fab2 #	Конвертаза C3, $\text{IC}_{50}$ (нМ)	$K_d$	Расщепление C4, $\text{IC}_{50}$ (нМ)
88	0,32	4,1	ND
41	0,35	0,30	0,81
11	0,46	0,86	<2 нМ
86	0,53	1,4	ND
81	0,54	2,0	ND
66	0,92	4,5	ND
57	0,95	3,6	<2 нМ
40	1,1	7,2	0,68
58	1,3	2,6	ND
60	1,6	3,1	ND
52	1,6	5,8	<2 нМ
63	2,0	6,6	ND
49	2,8	8,5	<2 нМ
89	3,0	2,5	ND
71	3,0	10,5	ND
87	6,0	2,5	ND
67	10,0	7,7	ND

Как показано выше в табл. 7, из 50 протестированных Fab2 против MASP-2, семнадцать Fab2 идентифицированы как Fab2, блокирующие MASP-2, которые потенциально ингибируют формирование конвертазы C3 с  $\text{IC}_{50}$ , равной или меньшей 10 нМ Fab2 (частота отбора положительных наилучших кандидатов 34%). Восемь из семнадцати идентифицированных Fab2 имеют  $\text{IC}_{50}$  в субнаномолярном диапазоне. Кроме того, для всех семнадцати Fab2, блокирующих MASP-2, показанных в табл. 7, получили по существу полное ингибирование формирования конвертазы C3 в анализе конвертазы C3 лектинового пути. На фиг. 8А графически проиллюстрированы результаты анализа формирования конвертазы C3 для антитела Fab2 #11, которое является репрезентативным для других протестированных антител Fab2, результаты для которых показаны в табл. 7. Это важные сведения, поскольку теоретически возможно, что "блокирующее" Fab2 может только частично ингибировать функцию MASP-2, даже когда каждая молекула MASP-2 связывается с Fab2.

Хотя маннан является известным активатором лектинового пути, существует теоретическая возможность того, что присутствие антител против маннана в сыворотке крыс может также активировать классический путь и приводить к образованию C3b посредством конвертазы C3 классического пути. Однако каждое из семнадцати блокирующих Fab2 против MASP-2, перечисленных в этом примере, потенциально может ингибировать образование C3b (>95%), таким образом, показывая специфичность данного анализа для конвертазы C3 лектинового пути.

Анализы связывания также проводили для всех семнадцати блокирующих Fab2 для расчета кажущейся  $K_d$  для каждого. Результаты анализов связывания Fab2 против MASP-2 крысы с нативным MASP-2 крысы для шести из блокирующих Fab2 также показаны в табл. 7. На фиг. 8В графически проиллюстрированы результаты анализа связывания с антителом Fab2 #11. Для других Fab2 также проводили подобные анализы связывания, результаты которых показаны в табл. 7. Как правило, кажущиеся  $K_d$ , полученные для связывания каждого из шести Fab2 с "нативными" MASP-2, сравнительно точно соответствуют  $\text{IC}_{50}$  для Fab2 в функциональном анализе конвертазы C3. Существуют доказательства того, что MASP-2

подвергается конформационным изменениям от "неактивной" до "активной" форме при активации ее протеазной активности (Feinberg et al., *EMBO J* 22:2348 59 (2003); Gal et al., *J. Biol. Chem.* 280:33435 44 (2005)). В нормальной плазме крыс, используемой в анализе формирования конвертазы C3, MASP-2 присутствует в первую очередь в "неактивной" конформации зимогена. В отличие от этого, в анализе связывания, MASP-2 присутствует как часть комплекса с MBL, связанным с иммобилизованным маннаном; таким образом, MASP-2 находится в "активной" конформации (Petersen et al., *J. Immunol Methods* 257:107 16, 2001). Следовательно, не следует ожидать точного соответствия между  $IC_{50}$  и  $K_d$  для каждого из семнадцати блокирующих Fab2, протестированных в этих двух функциональных анализах, поскольку в каждом анализе Fab2 связывается с различными конформационными формами MASP-2. Тем не менее, за исключением Fab2 #88, по-видимому существует точное соответствие между  $IC_{50}$  и кажущейся  $K_d$  для каждого из других шестнадцати Fab2, протестированных в двух анализах (см. табл. 7).

Несколько блокирующих Fab2 оценивали по ингибированию зависимого от MASP-2 расщепления C4. На фиг. 8С графически проиллюстрированы результаты анализа расщепления C4, показывающие ингибирование с использованием Fab2 #41, с  $IC_{50}=0,81$  нМ (см. табл. 7). Как показано на фиг. 9, обнаружено, что все из протестированных Fab2 ингибируют расщепление C4 с  $IC_{50}$ , сходными с полученными в анализе конвертазы C3 (см. табл. 7).

Хотя маннан является известным активатором лектинового пути, существует теоретическая возможность того, что присутствие антител против маннан в сыворотке крыс может также активировать классический путь и, таким образом, приводить к образованию C4b посредством опосредованного C1 расщепления C4. Однако, идентифицировано несколько Fab2 против MASP-2, которые сильно ингибируют образование C4b (>95%), таким образом, показывая специфичность этого анализа для опосредованного MASP-2 расщепления C4. C4, подобно C3, содержит необычные и высоко реакционноспособные тиоэфирные группы в качестве части структуры. При расщеплении C4 посредством MASP-2 в этом анализе, тиоэфирная группа на C4b может формировать ковалентную связь с гидроксильными группами или аминоклассами на макромолекулах, иммобилизованных на дне пластиковых лунок посредством эфирных или амидных связей, таким образом, облегчая детекцию C4b в анализе ELISA.

Эти исследования явно показывают получение высокоаффинных FAB2 против крысиного белка MASP-2, которые функционально блокируют активность конвертазы как C4, так и C3, таким образом, предотвращая активацию лектинового пути.

Пример 11.

В этом примере описано картирование эпитопов нескольких блокирующих антител Fab2 против MASP-2 крысы, полученных, как описано в примере 10.

Способы.

Как показано на фиг. 10, следующие белки, все с N-концевыми метками 6X His, экспрессировали в клетках CHO с использованием вектора pED4:

крысиный MASP-2A, полноразмерный белок MASP-2, инактивированный посредством замены серина в активном центре на аланин (S613A);

крысиный MASP-2K, полноразмерный белок MASP-2, измененный для уменьшения аутоактивации (R424K);

CUBI II, N-концевой фрагмент крысиного MASP-2, содержащий только домен CUBI, подобный EGF домен и домен CUBII; и

CUBI/подобный EGF домен, N-концевой фрагмент крысиного MASP-2 содержащий только домен CUBI и подобный EGF домен.

Эти белки очищали из культуральных супернатантов посредством никель-аффинной хроматографии, как описано ранее (Chen et al., *J. Biol. Chem.* 276:25894 02 (2001)).

А С-концевой полипептид (CCPII-SP), содержащий CCPII и домен сериновой протеазы крысиного MASP-2, экспрессировали *E. coli* в форме слитого с тиоредоксином белка с использованием pTtxFus (Invitrogen). Белок очищали из лизатов клеток с использованием аффинной смолы Thiobond. Партнер по слиянию тиоредоксин экспрессировали из пустого pTtxFus в качестве отрицательного контроля.

Все рекомбинантные белки подвергали диализу в буфере TBS, и их концентрации определяли посредством измерения OD при 280 нм.

Дот-блот анализ.

Серийные разведения пяти рекомбинантных полипептидов MASP-2, описанных выше и показанное на фиг. 10 (и полипептида тиоредоксина в качестве отрицательного контроля для полипептида CCPII-сериновой протеазы) наносили пятнами на нитроцеллюлозную мембрану. Количество нанесенного пятнами белка находилось в диапазоне от 100 нг до 6,4 пг, в пятикратных разведениях. В более поздних экспериментах, количество нанесенного пятнами белка находилось в диапазоне от 50 нг с понижением до 16 пг, снова в пятикратных разведениях. Мембраны блокированы с использованием 5% порошка снятого сухого молока в TBS (блокирующего буфера), затем инкубировали с 1,0 мкг/мл Fab2 против MASP-2 в блокирующем буфере (содержащем 5,0 мМ  $Ca^{2+}$ ). Связанные Fab2 детектировали с использованием конъюгированного с HRP антитела против Fab человека (AbD/Serotec; разведенного 1/10000) и набора для детекции ECL (Amersham). Одну мембрану инкубировали с поликлональными Ab кролика против

MASP-2 человека (описано в Stover et al., J Immunol 163:6848 59 (1999)) в качестве положительного контроля. В этом случае, связанное Ab детектировали с использованием конъюгированного с HRP антитела козы против IgG кролика (Dako; разведенного 1/2000).

#### Анализ связывания MASP-2

Планшеты для ELISA покрывали с использованием 1,0 мкг/лунку рекомбинантного полипептид MASP-2A или CUBI II в карбонатном буфере (pH 9,0) в течение ночи при 4°C. Лунки блокировали с использованием 1% BSA в TBS, затем добавляли серийные разведения Fab2 против MASP-2 в TBS, содержащем 5,0 мМ Ca<sup>2+</sup>. Планшеты инкубировали в течение одного часа при RT. После промывки три раза с использованием TBS/tween/Ca<sup>2+</sup>, добавляли конъюгированное с HRP антитело против Fab человека (AbD/Serotec), разведенное 1/10000 в TBS/ Ca<sup>2+</sup>, и планшеты инкубировали в течение еще одного часа при RT. Связанное антитело детектировали с использованием набора субстрата пероксидазы TMB (Bio-rad).

#### Результаты.

Результаты дот-блот анализа, показывающие реакционную способность Fab2 по отношению к различным полипептидам MASP-2, представлены ниже в табл. 8. Численные значения, приведенные в табл. 8, указывают количество нанесенного пятнами белка, необходимое для получения приблизительно половины максимальной силы сигнала. Как показано, все полипептиды (за исключением только одного партнера по связыванию тиоредоксина) были распознаны посредством положительного контрольного Ab (поликлональной антисыворотки против MASP-2 человека, полученной от кроликов).

Таблица 8

Реакционная способность по отношению к различным рекомбинантным полипептидам крысиного MASP-2 в дот-блот анализах

Антитело Fab2 #	MA SP-2A	CUBI II	CUBI/подобный EGF	CCPII SP	Тиоредоксин
40	0,16 нг	NR	NR	0,8 нг	NR
41	0,16 нг	NR	NR	0,8 нг	NR
11	0,16 нг	NR	NR	0,8 нг	NR
49	0,16 нг	NR	NR	>20 нг	NR
52	0,16 нг	NR	NR	0,8 нг	NR
57	0,032 нг	NR	NR	NR	NR
58	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
60	0,4 нг	0,4 нг	NR	NR	NR
63	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
66	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
67	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
71	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
81	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
86	0,4 нг	NR	NR	10 нг	NR
87	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
Положительный контроль	<0,032 нг	0,16 нг	0,16 нг	<0,032 нг	NR

NR=нет реакции. Положительное контрольное антитело представляет собой поликлональную антисыворотку против MASP-2 человека, полученную от кроликов.

Все из Fab2 вступали в реакцию с MASP-2A, так же как с MASP-2K (данные не представлены). Большинство из Fab2 узнавали полипептид ССPII-SP, но не N-концевые фрагменты. Двумя исключениями являются Fab2 #60 и Fab2 #57. Fab2 #60 узнает MASP-2A и фрагмент CUBI-II, но не CUBI/подобный EGF полипептид или полипептид ССPII-SP, что позволяет предполагать его связывание с эпитопом в CUBII, или перекрывание домена CUBII и подобного EGF домена. Fab2 # 57 узнает MASP-2A, но ни один из тестируемых фрагментов MASP-2, что указывает на то, что Fab2 узнает эпитоп в ССPI. Fab2 #40 и #49 связываются только с полным MASP-2A. В анализе связывания ELISA, показанном на фиг. 11, Fab2 #60 также связывался с полипептидом CUBI-II полипептид, хоть и с немного более низкой кажущейся аффинностью.

Эти обнаружения показывают идентификацию уникальных блокирующих Fab2 с множественными областями белка MASP-2.

#### Пример 12.

В этом примере описаны результаты для MASP-2/- в модели на мышях дегенерации желтого пятна.

Уровень техники/Обоснование. Возрастная дегенерация желтого пятна (AMD) является ведущей причиной слепоты после возраста 55 в промышленно развитых странах. AMD возникает в двух основных формах: неоваскулярная (влажная) AMD и атрофическая (сухая) AMD. Неоваскулярная (влажная) форма



ответственна за 90% тяжелой потери зрения, ассоциированной с AMD, даже несмотря на то, что только у ~20% индивидуумов с AMD развивается влажная форма. Характерные клинические признаки AMD включают множественные друзы, географическую атрофию и хориоидальную неоваскуляризацию (CNV). В декабре 2004 г., FDA одобрило Макуген (пегаптаниб), новый класс офтальмологических лекарственных средств для специфического нацеливания на фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и блокирования его эффектов, для лечения влажной (неоваскулярной) формы AMD (Ng et al., *Nat Rev. Drug Discov* 5:123-32 (2006)). Несмотря на то, что Макуген представляет собой многообещающий новый вариант терапии для подгруппы пациентов с AMD, остается настоятельная необходимость разработки дополнительных видов лечения для этого комплексного заболевания. Множество независимых путей исследования указывают на центральную роль активации комплемента в патогенезе AMD. Патогенез хориоидальной неоваскуляризации (CNV), наиболее тяжелой формы AMD, может включать активацию путей комплемента.

Более двадцати пяти лет назад, Ryan описал модель CNV у животных с индуцированным лазером повреждением (Ryan, S.J., *Tr. Am. Oph. Soc.* LXXVII:707-745, 1979). Эта модель первоначально разработана с использованием макаков-резусов, однако, с тех пор такую же технологию использовали для разработки сходных моделей CNV на множестве лабораторных животных, включая мышей (Tobe et al., *Am. J. Pathol.* 153:1641-46, 1998). В этой модели, используют лазерную фотокоагуляцию для разрыва мембраны Бруха, это действие приводит к формированию мембран, подобных CNV. Индуцированная лазером модель изображает многие из важных признаков состояния у человека (недавний обзор, см. в Ambati et al., *Survey Ophthalmology* 48:257-293, 2003). В настоящее время хорошо разработана модель на мышах с индуцированным лазером повреждением, и ее используют в качестве экспериментальной основы для большого, и даже увеличивающегося, количества исследовательских проектов. Является общепринятым, что индуцированная лазером модель разделяет достаточное биологическое сходство с CNV у человека, чтобы доклинические исследования патогенеза и ингибирования посредством лекарственных средств с использованием этой модели, являются соответствующими CNV у человека.

Способы.

Мышь MASP-2<sup>-/-</sup> получали, как описано в примере 1, и подвергали обратному скрещиванию с C57Bl/6 в течение 10 поколений. В настоящем исследовании сравнивали результаты, когда самцов мышей MASP-2<sup>(-/-)</sup> и MASP-2<sup>(+/+)</sup> оценивали в ходе индуцированной лазером CNV, улучшенной модели неоваскулярной AMD, фокусируясь на объеме индуцированной лазером CNV, по сканирующей лазерной конфокальной микроскопии, в качестве показателя повреждения тканей, и определении уровней VEGF, сильного ангиогенного фактора, вовлеченного в CNV, в пигментном эпителии сетчатки (RPE)/хороидах посредством ELISA после лазерного повреждения.

Индукция хориоидальной неоваскуляризации (CNV). Лазерную фотокоагуляцию (532 нм, 200 мВт, 100 мс, 75 мкм; Oculight GL, Iridex, Mountain View, CA) проводил для обоих глаз каждого животного на сутки ноль один индивидуальный специалист, неосведомленный о распределении по группам лекарственных средств. Лазерные пятна наносили стандартизированным образом вокруг оптического нерва при использовании системы установки щелевой лампы и покровного стекла в качестве контактной линзы. Морфологической конечной точкой лазерного поражения являлось появление кавитационного пузырька, что считали признаком, коррелирующим с повреждением мембраны Бруха. Далее следует подробное описание способов и оцененных конечных точек.

Ангиография с флуоресцеином. Ангиографию с флуоресцеином проводили с использованием камеры и системы визуализации (камера TRC 50 1A; система ImageNet 2.01; Topcon, Paramus, NJ) через 1 неделю после лазерной фотокоагуляции. Фотографии получали с использованием линз 20-D в контакте с объективом съемочного аппарата с линзой фундус-камеры после внутривитреальной инъекции 0,1 мл 2,5% флуоресцеина натрия. Специалист по состоянию сетчатки, не участвующий в лазерной фотокоагуляции или ангиографии, оценивал флуоресцентные ангиограммы с флуоресцеином за один сеанс слепым способом.

Объем хориоидальной неоваскуляризации (CNV). Через одну неделю после лазерного повреждения, глаза вырезали и фиксировали с использованием 4% параформальдегида в течение 30 мин при 4°C. Глазное дно получали посредством удаления передних фрагментов и промывали три раза в PBS, с последующей дегидратацией и регидратацией с применением серий разведений метанола. После двукратного блокирования буфером (PBS, содержащим 1% бычий сывороточный альбумин и 0,5% Triton X 100) в течение 30 минут при комнатной температуре, глазное дно инкубировали в течение ночи при 4°C с 0,5% FITC-изолектином B4 (Vector laboratories, Burlingame, CA), разведенным в PBS, содержащем 0,2% BSA и 0,1% Triton X 100, который связывает концевые остатки β-D-галактозы на поверхности эндотелиальных клеток и избирательно помечает сосудистую сеть мыши. После двух промывок PBS, содержащим 0,1% Triton X 100, нейросенсорную сетчатку осторожно отслаивали и отделяли от оптического нерва. Затем выполняли четыре ослабляющих радиальных надреза, и оставшийся комплекс RPE-хороид-склера комплекс погружали в среду, препятствующую выгоранию флуоресценции (Immu Mount Vectashield Mounting Medium; Vector Laboratories) и накрывали покровным стеклом.

Погруженные образцы исследовали с использованием конфокального лазерного сканирующего

микроскопа (TCS SP; Leica, Heidelberg, Germany). Сосуды визуализировали посредством возбуждения голубым аргоном с длиной волны (488 нм) и захвата излучения между 515 и 545 нм. Во всех исследованиях визуализации использовали 40X масляно-иммерсионный объектив. Горизонтальные оптические срезы (с шагом 1 мкм) получали с поверхности комплекса RPE-хороид-склера. Самую глубокую фокальная плоскость, в которой можно было идентифицировать окружающую хориоидальную сосудистую сеть, связанную с поражением, рассматривали в качестве основания поражения. Любой сосуд, находящийся в области-мишени для лазерного воздействия и расположенный на поверхности этой эталонной плоскости, оценивали как CNV. Изображения каждого среза сохраняли в цифровом виде. Площадь связанной с CNV флуоресценции измеряли посредством компьютеризированного анализа изображений с использованием программного обеспечения для электронного микроскопа (TCS SP; Leica). Суммирование всей флуоресцентной области в каждом горизонтальном срезе использовали как показатель объема CNV. Визуализацию проводил оператор, неосведомленный о распределении по группам лекарственных средств.

Поскольку на вероятность развития CNV для каждого лазерного поражения влияет группа, к которой оно принадлежит (мышь, глаз и лазерное пятно), средние объемы поражения сравнивали с использованием способа линейной смешанной модели, поделенной на делянки по принципу повторяющихся измерений. Фактор всего поля представлял собой генетическую группу, к которой принадлежали животные, в то время как фактор делянки представлял собой глаз. Статистическую значимость определяли на уровне 0,05. Апостериорные сравнения средних проводили с использованием поправки Бонферрони для множественных сравнений.

ELISA VEGF. Через трое суток после поражения посредством 12 лазерных пятен, комплекс RPE-хороид обрабатывали ультразвуком в буфере для лизиса (20 мМ имидазол HCl, 10 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ EGTA, 1% Triton X 100, 10 мМ NaF, 1 мМ молибдат Na, и 1 мМ ЭДТА с ингибиторами протеаз) на льду в течение 15 мин. Уровни белка VEGF в супернатанте определяли с использованием набора для ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN), узнающего все варианты сплайсинга, при 450-570 нм (Emax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA), и нормализовали по общему содержанию белка. Измерения в двух повторах выполнял слепым способом оператор, не участвующий в фотокоагуляции, визуализации или ангиографии. Количества VEGF представляли как среднее +/- SEM по меньшей мере для трех независимых экспериментов и сравнивали с использованием U-критерия Манна-Уитни. Нулевую гипотезу отклоняли при P<0,05.

Результаты.

Оценка уровней VEGF.

На фиг. 12А графически проиллюстрированы уровни белка VEGF в комплексе RPE-хороид, выделенном от мышей дикого типа C57Bl6 и мышей MASP-2(-/-) на сутки ноль. Как показано на фиг. 12А, оценка уровней VEGF показывает уменьшение фоновых уровней VEGF у мышей MASP-2 (-/-) по сравнению с контрольными мышами дикого типа C57bl. На фиг. 12В графически проиллюстрированы уровни белка VEGF, измеренные на сутки три после индуцированного лазером повреждения. Как показано на фиг. 12В, уровни VEGF значимо увеличивались у мышей дикого типа (+/+) через трое суток после индуцированного лазером повреждения, что согласуется с опубликованными исследованиями (Nozaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:2328 33 (2006)). Однако, неожиданно, очень низкие уровни VEGF наблюдали у мышей MASP-2 (-/-).

Оценка хориоидальной неоваскуляризации (CNV).

В дополнение к уменьшению уровней VEGF после индуцированной лазером дегенерации желтого пятна, площадь CNV определяли до и после лазерного повреждения. На фиг. 13 графически проиллюстрирован объем CNV, измеренный у мышей дикого типа C57Bl и у мышей MASP-2(-/-) на сутки семь после индуцированного лазером повреждения. Как показано на фиг. 13, для мышей MASP-2 (-/-) показано уменьшение площади CNV приблизительно на 30% после индуцированного лазером повреждения на сутки семь по сравнению с контрольными мышами дикого типа.

Эти обнаружения указывают на уменьшение VEGF и CNV, как наблюдали у мышей MASP (-/-) по сравнению с контрольными мышами дикого типа (+/+), и на то, что блокирование MASP-2 с использованием ингибитора может оказывать профилактический или терапевтический эффект в лечении дегенерации желтого пятна.

Пример 13.

В этом примере описан фармакодинамический анализ репрезентативных высокоаффинных антител Fab2 против MASP-2, идентифицированных, как описано в примере 10.

Уровень техники/обоснование.

Как описано в примере 10, для идентификации высокоаффинных антител, которые блокируют лектиновый путь у крыс, крысиный белок MASP-2 использовали для пэннинга библиотеки фагового дисплея. Эту библиотеку разработали с целью обеспечения высокого иммунологического разнообразия и конструировали с использованием полностью человеческих последовательностей генов иммуноглобулинов. Как описано в примере 10, идентифицировано приблизительно 250 индивидуальных клонов фагов, которые связываются с высокой аффинностью с крысиным белком MASP-2 посредством скрининга ELISA. Секвенирование этих клонов идентифицировало 50 уникальных фагов, кодирующих антитело про-

тив MASP-2. Белок Fab2 экспрессировали из этих клонов, очищали и анализировали по аффинности связывания MASP-2 и функционального ингибирования лектинового пути комплемента.

Как показано в табл. 7 из Примера 10, идентифицировали 17 Fab2 против MASP-2 с функциональной блокирующей активностью, идентифицированной в результате этого анализа (частота наилучших совпадений для блокирующих антител 34%). Функциональное ингибирование лектинового пути комплемента посредством Fab2 было заметно на уровне накопления C4, что является прямым показателем расщепления C4 посредством MASP-2. Важно, что ингибирование было в равной степени заметно при оценке активности конвертазы C3, показывающей функциональную блокаду лектинового пути комплемента. 17 идентифицированных блокирующих MASP-2 Fab2, идентифицированных, как описано в примере 10, сильно ингибируют образование конвертазы C3 с значениями  $IC_{50}$ , равными или меньшими чем 10 нМ. Восемь из 17 идентифицированных Fab2 имеют значения  $IC_{50}$  в субнаномолярном диапазоне. Более того, для всех 17 Fab2, блокирующих MASP-2, получили по существу полное ингибирование в анализе образования конвертазы C3 лектинового пути, как показано на фиг. 8А-С, и обобщено в табл. 7 из Примера 10. Более того, каждое из 17 блокирующих Fab2 против MASP-2, показанных в табл. 7, сильно ингибирует образование C3b (>95%), таким образом, показывая специфичность данного анализа для конвертазы C3 лектинового пути.

Варианты изотипов крысиных IgG2c и мышинных IgG2a полноразмерных антител получали из Fab2 #11. В этом примере описана характеристика этих изотипов *in vivo* по фармакодинамическим параметрам.

#### Способы.

Как описано в примере 10, крысиный белок MASP-2 использовали для пэннинга библиотеки фагового дисплея Fab, из которой идентифицировали Fab2#11. Варианты изотипов крысиных IgG2c и мышинных IgG2a полноразмерных антител получали из Fab2 #11. Изотипы как крысиных IgG2c, так и мышинных IgG2a полноразмерных антител характеризовали *in vivo* по фармакодинамическим параметрам следующим образом.

#### Исследование *In vivo* на мышах.

Фармакодинамическое исследование проводили на мышах для исследования эффекта дозирования антитела против MASP-2 на активность лектинового пути в плазме *in vivo*. В этом исследовании, накопление C4 измеряли *ex vivo* в анализе лектинового пути в различных временных точках после подкожного (SC) и внутрибрюшинного (IP) введения 0,3 мг/кг или 1,0 мг/кг мышинового МоАб против MASP-2 (мышинового полноразмерного антитела изотипа IgG2a, происходящего из Fab2#11).

На фиг. 14 графически проиллюстрировано специфическое для лектинового пути накопление C4b, измеренное *ex vivo* в неразбавленных образцах сыворотки, взятых у мышей (n=3 мыши/группу) в различных временных точках после подкожного дозирования либо 0,3 мг/кг, либо 1,0 мг/кг мышинового МоАб против MASP-2. Образцы сыворотки мышей, собранные перед дозированием антитела, служили в качестве отрицательного контроля (100% активность), в то время как сыворотку, дополненную *in vitro* 100 нМ такого же блокирующего антитела против MASP-2, использовали в качестве положительного контроля (0% активность).

Результаты, показанные на фиг. 14, демонстрируют быстрое и полное ингибирование накопления C4b после подкожного введения дозы 1,0 мг/кг мышинового МоАб против MASP-2. Частичное ингибирование накопления C4b наблюдали после подкожного введения дозы 0,3 мг/кг мышинового МоАб против MASP-2.

Зависимость от времени восстановления лектинового пути отслеживали в течение трех недель после однократного IP введения мышинового МоАб против MASP-2 при 0,6 мг/кг мышам. Как показано на фиг. 15, резкое снижение активности лектинового пути возникало после дозирования антитела с последующим полным ингибированием лектинового пути, которое продолжалось в течение приблизительно 7 суток после IP введения. Медленное восстановление активности лектинового пути наблюдали в течение второй и третьей недели с полным восстановлением лектинового пути у мышей через 17 суток после введения МоАб против MASP-2.

Эти результаты показывают, что мышиноое МоАб против MASP-2, происходящее из Fab2 #11, ингибирует лектиновый путь у мышей зависимым от дозы образом при системной доставке.

#### Пример 14.

В этом примере описан анализ мышинового МоАб против MASP-2, происходящего из Fab2 #11, по эффективности на мышинной модели связанной с возрастом дегенерации желтого пятна.

#### Уровень техники/обоснование.

Как описано в примере 10, крысиный белок MASP-2 использовали для пэннинга библиотеки фагового дисплея Fab, из которой идентифицировали Fab2#11 в качестве функционально активного антитела. Полноразмерные антитела крысиного IgG2c и мышинового IgG2a изотипов получали из Fab2 #11. Полноразмерное антитело против MASP-2 мышинового изотипа IgG2a характеризовали по фармакодинамическим параметрам, как описано в примере 13. В этом примере, мышиноое полноразмерное антитело против MASP-2, происходящее из Fab2 #11, анализировали в модели на мышах связанной с возрастом дегенерации желтого пятна (AMD), описанной в Bora P.S. et al., J Immunol 174:491-497 (2005).

Способы.

Мышиное полноразмерное антитело изотипа IgG2a против MASP-2, происходящее из Fab2 #11 как описано в примере 13, тестировали в модели на мышах связанной с возрастом дегенерации желтого пятна (AMD), как описано в примере 12, со следующими модификациями.

Введение мышинных MoAb против MASP-2.

Две различные дозы (0,3 мг/кг и 1,0 мг/кг) мышинного MoAb против MASP-2 вместе с обработкой контрольным для изотипа MoAb, инъецировали IP мышам WT (+/+) (n=8 мышей на группу) за 16 часов до индукции CNV.

Индукция хориоидальной неоваскуляризации (CNV).

Индукцию хориоидальной неоваскуляризации (CNV) и измерение объема CNV проводили с использованием лазерной фотокоагуляции, как описано в примере 12.

Результаты.

На фиг. 16 графически проиллюстрирована площадь CNV, измеренная через 7 суток после лазерного повреждения у мышей, подвергнутых обработке либо контрольным для изотипа MoAb, либо мышинным MoAb против MASP-2 (0,3 мг/кг и 1,0 мг/кг). Как показано на фиг. 16, у мышей, подвергнутых предварительной обработке 1,0 мг/кг MoAb против MASP-2, наблюдали статистически значимое ( $p < 0,01$ ) уменьшение CNV приблизительно на 50% через 7 суток после обработки лазером. Как дополнительно показано на фиг. 16, наблюдали, что доза 0,3 мг/кг MoAb против MASP-2 не была эффективной для уменьшения CNV. Отмечено, что для дозы 0,3 мг/кг MoAb против MASP-2 показано частичное и временное ингибирование накопления C4b после подкожного введения, как описано в примере 13 и показано на фиг. 14.

Результаты, описанные в этом примере, показывают, что блокирование MASP-2 ингибитором, таким как MoAb против MASP-2, имеет профилактический и/или терапевтический эффект при лечении дегенерации желтого пятна. Отмечено, что эти результаты согласуются с результатами, наблюдаемыми в исследовании, проведенном на мышах MASP-2 (-/-), описанном в примере 12, в котором наблюдали уменьшение CNV на 30% через 7 суток после обработки лазером, у мышей MASP-2 (-/-), по сравнению с контрольными мышами дикого типа. Кроме того, результаты в этом примере дополнительно показывают, что антитело против MASP-2 при системной доставке обеспечивает местное терапевтическое преимущество для глаза, таким образом, подчеркивая потенциал системного способа введения для лечения пациентов с AMD пациенты. В общем эти результаты предоставляют доказательство, поддерживающее использование MASP-2 MoAb в лечении AMD.

Пример 15.

В этом примере описана идентификация, с использованием фагового дисплея, полностью человеческих антител scFv, которые связываются с MASP-2 и ингибируют опосредованную лектином активацию комплемента, в то же время оставляя в то же время оставляя компонент классического (зависимого от C1q) пути иммунной системы интактным.

Обзор.

Полностью человеческие, высокоаффинные антитела против MASP-2 идентифицировали посредством скрининга библиотеки фагового дисплея. Вариабельные фрагменты легкой и тяжелой цепи антител выделяли как в формате scFv, так и в формате полноразмерного IgG. Человеческие антитела против MASP-2 можно использовать для ингибирования клеточного повреждения, ассоциированного с опосредованной лектиновым путем активацией альтернативного пути комплемента, в то же время оставляя компонент классического (зависимого от C1q) пути иммунной системы интактным. В некоторых вариантах осуществления, рассматриваемые ингибирующие MASP-2 антитела имеют следующие характеристики: (а) высокая аффинность для MASP-2 человека (например,  $K_D$  10 нМ или менее), и (б) ингибирует зависимую от MASP-2 активность комплемента в 90% сыворотки человека с  $IC_{50}$  30 нМ или менее.

Способы.

Экспрессия полноразмерного каталитически неактивного MASP-2.

Полноразмерную последовательность кДНК человеческого MASP-2 (SEQ ID NO: 4), кодирующего полипептид человеческого MASP-2 с лидерной последовательностью (SEQ ID NO: 5) субклонировали в экспрессирующий вектор для млекопитающих pCI Neo (Promega), управляющей эукариотической экспрессией под контролем энхансерной/промоторной области CMV (описанной в Kaufman R.J. et al., Nucleic Acids Research 19:4485 90, 1991; Kaufman, Methods in Enzymology, 185:537 66 (1991)).

Для получения каталитически неактивного человеческого белка MASP-2A, проводили сайт-направленный мутагенез, как описано в US2007/0172483, содержание которого приведено, таким образом, в настоящем описании в качестве ссылки. Продукты ПЦР очищали после электрофореза в агарозном геле и получения полосы, и перекрывание одиночного аденозина получали с использованием стандартного способа получения хвостов. Затем снабженный аденозиновым хвостом MASP-2A клонировали в вектор pGEM T easy и трансформировали в *E. coli*. Человеческий MASP-2A затем субклонировали в любой из экспрессирующих векторов для млекопитающих pED или pCI Neo.

Экспрессирующей MASP-2A конструкцией, описанной выше, трансфицировали клетки DXB1 с использованием стандартного способа трансфекции с фосфатом кальция (Maniatis et al., 1989). MASP-2A

продуцировали в бессывороточной среде для обеспечения того, чтобы препараты не были загрязнены другими белками сыворотки. Собирали среды с конфлюэнтных клеток каждые вторые сутки (всего четыре раза). Средний уровень рекомбинантного MASP-2А составлял приблизительно 1,5 мг/литр культуральной среды. MASP-2А (мутант Ser-Ala, описанной выше) очищали посредством аффинной хроматографии на колонках с MBP-A агарозой.

ELISA MASP-2А для клонов-кандидатов scFv, идентифицированных посредством пэннинга/конверсии scFv и скрининга на фильтре.

Библиотеку фагового дисплея последовательностей вариабельной области легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов человека подвергали пэннинга с антигеном с последующим автоматическим скринингом и отбором антител для идентификации высокоаффинных антител scFv против человеческого белка MASP-2. Проводили три цикла пэннинга фаговой библиотеки scFv против меченного HIS или меченного биотином MASP-2А. После третьего цикла пэннинга проводили элюцию сначала с использованием MBL и затем с использованием TEA (щелочи). Для мониторинга специфического обогащения фагов, экспонирующих фрагменты scFv против мишени - MASP-2А, проводили поликлональный фаговый ELISA против иммобилизованного MASP-2А. Гены scFv из 3 цикла пэннинга клонировали в экспрессирующий вектор pHOG и проводили скрининг на фильтрах в малом масштабе для поиска специфических клонов против MASP-2А.

Бактериальные колонии, содержащие плазмиды, кодирующие фрагменты scFv из третьего цикла пэннинга, отбирали, наносили на сетку на нитроцеллюлозных мембранах и выращивали в течение ночи на неиндуцирующей среде для получения исходных планшетов. Всего 18000 отобрали и анализировали из третьего цикла пэннинга, половину после конкурентной элюции и половину после последующей элюции TEA. При пэннинге библиотеки фагмидов scFv против MASP-2А с последующими конверсией scFv и скринингом на фильтрах выявили 137 положительных клонов. 108/137 клонов являлись положительными в анализе ELISA по связыванию с MASP-2 (данные не представлены), из них 45 дополнительно анализировали по способности блокировать активность MASP-2 в нормальной сыворотке человека.

Анализ для измерения ингибирования формирования конвертазы C3 лектинового пути.

Функциональный анализ, который измеряет ингибирование формирования конвертазы C3 лектинового пути, использовали для оценки "блокирующей активности" клонов-кандидатов scFv против MASP-2. Активность сериновой протеазы MASP-2 является необходимой для образования двух белковых компонентов (C4b, C2a), которые содержит конвертаза C3 лектинового пути. Таким образом, scFv против MASP-2, ингибирующий функциональную активность MASP-2 (т.е., блокирующий MASP-2 scFv), ингибирует формирование de novo конвертазы C3 лектинового пути. C3 содержит нетипичную и высоко реакционноспособную тиозфирную группу в качестве части структуры. При расщеплении C3 посредством конвертазы C3 в этом анализе, тиозфирная группа на C3b может формировать ковалентную связь с гидроксильной группой или аминокислотной группой на макромолекулах, иммобилизованных на дне пластиковых лунок, посредством сложноэфирных или амидных связей, таким образом, облегчая детекцию C3b в анализе ELISA.

Дрожжевой маннан является известным активатором лектинового пути. В следующем способе для измерения формирования конвертазы C3, пластиковые лунки, покрытые маннаном, инкубировали с разведенной человеческой сывороткой для активации лектинового пути. Затем лунки промывали и анализировали C3b, иммобилизованный в лунках, с использованием стандартных способов ELISA. Количество C3b, образованного в этом анализе, является прямым отражением формирования de novo конвертазы C3 лектинового пути. Клоны scFv против MASP-2 в выбранных концентрациях тестировали в этом анализе по их способности ингибировать формирование конвертазы C3 и последующее образование C3b.

Способы.

45 клонов-кандидатов, идентифицированных, как описано выше, экспрессировали, очищали и разводили до одинаковой концентрации для хранения, которую снова разводили в содержащем  $\text{Ca}^{++}$  и  $\text{Mg}^{++}$  буфере GVB (4,0 мМ барбитал, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2,0 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0,1% желатин, pH 7,4), чтобы убедиться, что все клоны имеют одно и то же количество буфера. Каждый из клонов scFv тестировали в трех повторах в концентрации 2 мкг/мл. Положительный контроль представлял собой Fab2 OMS100, и его тестировали при 0,4 мкг/мл. Формирование C3с монитировали в присутствии и в отсутствие клонов scFv/IgG.

Маннан разводили до концентрации 20 мкг/мл (1 мкг/лунку) в 50 мМ карбонатном буфере (15 мМ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ +35 мМ  $\text{NaHCO}_3$ +1,5 мМ  $\text{NaN}_3$ ), pH 9,5, и покрывали планшет для ELISA в течение ночи при 4°C. На следующие сутки, покрытые маннаном планшеты промывали 3 раза с использованием 200 мкл PBS. Затем 100 мкл блокирующего раствора 1% HSA добавляли в лунки и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза с использованием 200 мкл PBS, и сохраняли на льду с 200 мкл PBS до добавления образцов.

Нормальную человеческую сыворотку разводили до 0,5% в буфере CaMgGVB, и клоны scFv или положительный контроль Fab2 OMS100 добавляли в трех повторах при 0,01 мкг/мл; 1 мкг/мл (только контроль OMS100) и 10 мкг/мл в этот буфер и предварительно инкубировали 45 минут на льду перед добавлением в заблокированный планшет ELISA. Реакцию инициировали посредством инкубации в тече-

ние одного часа при 37°C и останавливали посредством переноса планшетов в ледяную баню. Накопление C3b детектировали с использованием антитела кролика против C3с мыши, затем антитела козы против антитела кролика с HRP. Отрицательный контроль представлял собой буфер без антитела (отсутствие антитела=максимальное накопление C3b), и положительный контроль представлял собой буфер с ЭДТА (отсутствие накопления C3b). Фон определяли посредством проведения такого же анализа, за исключением того, что лунки не содержали маннана. Фоновый сигнал для планшетов без маннана вычитали из сигналов в содержащих маннан лунках. Критерий отсеечения устанавливали на половину активности не имеющего отношения к делу клона scFv (VZV) и только буфера.

Результаты. На основании критерия отсеечения, обнаружили, что всего 13 клонов блокируют активность MASP-2. Все 13 клонов, приводящие к > 50% супрессии пути, отбирали и секвенировали, получив 10 уникальных клонов. Обнаружили, что все десять клонов имеют одинаковый подкласс легких цепей,  $\lambda$ 3, но три различных подкласса тяжелых цепей: VH2, VH3 и VH6. В функциональном анализе, для пяти из десяти клонов-кандидатов scFv получили значения IC<sub>50</sub> нМ, меньшие, чем целевой критерий 25 нМ с использованием 0,5% человеческой сыворотки.

Для идентификации антител с улучшенной активностью, три исходных клон scFv, идентифицированных, как описано выше, подвергли перетасовке легких цепей. Этот способ включает получение комбинаторной библиотеки, состоящей из VH из каждого из исходных клонов, спаренных с библиотекой наивных, человеческих легких цепей (VL) лямбда, полученных от шести здоровых доноров. Затем эту библиотеку подвергли скринингу по клонам scFv с улучшенной аффинностью связывания и/или функциональностью.

Таблица 9

Сравнение функциональной активности по IC<sub>50</sub> (нМ) лидирующих дочерних клонов и их соответствующих исходных клонов (все в формате scFv)

клон scFv	1% человеческая сыворотка анализ C3 (IC <sub>50</sub> нМ)	90% человеческая сыворотка анализ C3 (IC <sub>50</sub> нМ)	90% человеческая сыворотка анализ C4 (IC <sub>50</sub> нМ)
17D20mc	38	nd	nd
17D20m_d3521N11	26	>1000	140
17N16mc	68	nd	nd
17N16m_d17N9	48	15	230

Ниже представлены последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) для исходных клонов и дочерних клонов, показанных выше в табл. 9.

CDR по Kabat (31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-107 (H3)) выделены жирным шрифтом; и CDR по Chothia (26-32 (H1), 52-56 (H2) и 95-101 (H3)) подчеркнуты.

Вариабельная область тяжелой цепи (VH) 17D20\_35VH-21N11VL (SEQ ID NO: 67, кодирована SEQ ID NO: 66)

QVTLKESGPVLVKPTE~~TLTLTCTVSGFSLSRGKMGV~~SWIRQPPGKALEWLAHIFSSDEK

SYRTSLKSR~~LTI~~SKDTSKNQVVLMTNMDPVD~~TATYYCARIR~~GGIDYWGQGT~~LVTVSS~~

Вариабельная область тяжелой цепи (VH) d17N9 (SEQ ID NO: 68)

QVQLQQSGPGLVKPSQ~~TL~~SLTCAISGDSVSS~~TSAA~~WNWIRQSPSRGLEWLGRTTYRSKW

YNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAV~~VYYCARD~~PFGV~~PF~~DIWGQGTMTVTVSS

Ниже представлены последовательности вариабельной области легкой цепи (VL) последовательно для исходных клонов и дочерних клонов.

CDR по Kabat (24-34 (L1); 50-56 (L2); и 89-97 (L3)) выделены жирным шрифтом; и CDR по Chothia (24-34 (L1); 50-56 (L2) и 89-97 (L3)) подчеркнуты. Эти области являются одинаковыми, независимо от нумерации посредством системы Kabat или Chothia.

Вариабельная область легкой цепи (VL) 17D20m\_d3521N11 (SEQ ID NO: 69)

QPVLTQPPSLSVSPGQTASITCS~~GEKLGDKYAYW~~YQQKPGQSPVLMYQDKORPSGIPPE

RFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQ~~AWDSSTAVE~~GGGTKLTVL

Вариабельная область легкой цепи (VL) 17N16m\_d17N9 (SEQ ID NO: 71, кодирована SEQ ID NO: 70)

SYELIQPPSVSVAPGQTATITCA~~GDNLGKKRVHW~~YQQRPGQAPV~~LV~~IYDD~~SDRPSG~~IPDP

RFASNSGNTATLTITRGEAGDEADYYCQ~~VWDIATDHV~~VFGG~~TKLTVL~~AAAGSEQKLISE

Антитела против MASP-2 OMS100 и MoAb\_d3521N11VL, (содержащие вариабельную область тяжелой цепи, приведенную как SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи, приведенную как SEQ ID NO: 69, также обозначенную как "OMS646"), для обоих из которых показано связывание с MASP-2 человека с высокой аффинностью и наличие способности блокировать функциональную актив-

ность комплемента, анализировали применительно к связыванию эпитопов посредством анализа дот-блоттинга. Результаты показывают, что антитела OMS646 и OMS100 являются высоко специфическими для MASP-2 и не связываются с MASP-1/3. Ни одно из антител не связывалось ни с фрагментами MAp19, ни с фрагментами MASP-2, которые не содержали домен CCP1 из MASP-2, что привело к заключению, что участки связывания включают CCP1.

Определили, что антитело против MASP-2 OMS646 avidно связывается с рекомбинантным MASP-2 (Kd 60-250 нМ) с >5000-кратной избирательностью по сравнению с Cls, Clr или MASP-1 (см. табл. 10 ниже).

Таблица 10  
Аффинность и специфичность взаимодействия антитело OMS646 против MASP-2 - MASP-2, как оценено посредством исследований твердофазного ELISA

Антиген	K <sub>D</sub> (нМ)
MA SP-1	>500000
MA SP-2	62±23*
MA SP-3	>500000
Очищенный человеческий Clr	>500000
Очищенный человеческий Cls	~500000

\* Среднее±SD; n=12.

OMS646 специфически блокирует зависимую от лектина активацию терминальных компонентов комплемента.

Способы.

Эффект OMS646 на накопление мембраноатакующего комплекса (MAC) анализировали с использованием специфических для пути условий для лектинового пути, классического пути и альтернативного пути. Для этой цели, использовали набор для скрининга комплемента Wieslab Comp300 (Wieslab, Lund, Sweden), следуя инструкциям производителя.

Результаты.

На фиг. 17А графически проиллюстрирован уровень накопления MAC в присутствии или в отсутствие антитела против MASP-2 (OMS646) в условиях анализа, специфических для лектинового пути. На фиг. 17В графически проиллюстрирован уровень накопления MAC в присутствии или в отсутствие антитела против MASP-2 (OMS646) в условиях анализа, специфических для классического пути. На фиг. 17С графически проиллюстрирован уровень накопления MAC в присутствии или в отсутствие антитела против MASP-2 (OMS646) в условиях анализа, специфических для альтернативного пути.

Как показано на фиг. 17А, OMS646 блокирует опосредованную лектиновым путем активацию накопления MAC с значением IC<sub>50</sub> приблизительно 1 нМ. Однако, OMS646 не оказывало эффекта на накопление MAC, полученное в результате опосредованной классическим путем активации (фиг. 17В) или в результате опосредованной альтернативным путем активации (фиг. 17С).

Фармакокинетика и фармакодинамика OMS6 4 6 после внутривенного (IV) или подкожного (SC) введения мышам.

Фармакокинетику (PK) и фармакодинамику (PD) OMS646 оценивали в 28-суточном исследовании PK/PD однократной дозы у мышей. В исследовании тестировали уровни дозирования 5 мг/кг и 15 мг/кг OMS646, введенные подкожно (SC), так же как уровень дозирования 5 мг/кг OMS646, введенный внутривенно (IV).

Применительно к профилю PK OMS646, на фиг. 18 графически проиллюстрирована концентрация OMS646 (среднее из n=3 животных/группы) как функцию от времени после введения OMS646 в указанной дозе. Как показано на фиг. 18, при 5 мг/кг SC, OMS646 достигало максимальной концентрации в плазме 5-6 мкг/мл приблизительно через 1-2 суток после дозирования. Биодоступность OMS646 при 5 мг/кг SC составляла приблизительно 60%. Как далее показано на фиг. 18, при 15 мг/кг SC, OMS646 достигало максимальной концентрации в плазме 10-12 мкг/мл приблизительно через 1-2 суток после дозирования. Для всех групп, OMS646 медленно выводилось из системного кровотока с терминальным временем полужизни приблизительно 8-10 суток. Профиль OMS646 является типичным для человеческих антител у мышей.

PD активность OMS646 графически проиллюстрирована на фиг. 19А и 19В. На фиг. 19А и 19В показан ответ PD (падение системной активности лектинового пути) для каждой мыши в группах 5 мг/кг IV (фиг. 19А) и 5 мг/кг SC (фиг. 19В). Пунктирной линией показан фон анализа (максимальное ингибирование; сыворотка наивных мышей с добавлением *in vitro* избытка OMS646 до анализа). Как показано на фиг. 19А, после IV введения 5 мг/кг OMS646, системная активность лектинового пути немедленно падала до почти не поддающихся детекции уровней, и для активности лектинового пути показано только умеренное восстановление в течение периода наблюдения 28 суток. Как показано на фиг. 19В, у мышей после дозирования 5 мг/кг OMS646 SC, наблюдали зависимое от времени ингибирование активности лектинового пути. Активность лектинового пути падала до почти не поддающихся детекции уровней в

течение 24 часов после введения лекарственного средства и оставалась на низких уровнях в течение по меньшей мере 7 суток. Активность лектинового пути постепенно увеличивалась с течением времени, однако не возвращалась к уровням до дозирования в течение периода наблюдения 28 суток. Наблюдаемая активность лектинового пути в зависимости от профиля времени после введения 15 мг/кг SC являлась сходной с активностью для дозы 5 мг/кг SC dose (данные не представлены), показывая насыщение конечной точки PD. Эти данные дополнительно показывают, что еженедельные дозы 5 мг/кг OMS646, введенные либо IV, либо SC, являются достаточными для достижения постоянной супрессии системной активности лектинового пути у мышей.

Пример 16.

В этом примере описан анализ эффективности моноклонального антитела против MASP-2 (OMS646), человеческого антитела IgG4, которое блокирует функцию лектинового пути, в модели на мышах связанной с возрастом дегенерации желтого пятна.

Уровень техники/Обоснование.

Как описано в примере 15, получено полностью человеческое моноклональное антитело против MASP-2 (OMS646), которое специфически блокирует функцию лектинового пути человека. В этом примере, OMS646 анализировали в модели на мышах индуцированной лазером хориоидальной неоваскуляризации (CNV), общепотребительной модели связанной с возрастом дегенерации желтого пятна (AMD), описанной в Bora et al. (*J Immunol* 174:491-497, 2005) вместе с антителом против VEGF в качестве сравнительного антитела.

Способы.

В этом исследовании оценивали эффект трех уровней дозирования OMS646 (2 мг/кг; 5 мг/кг и 20 мг/кг SC) по сравнению с обработкой носителем. mAb против MASP-2 мыши, происходящее из Fab2 #11 (3 мг/кг SC), полученное, как описано в примере 14, и крысиное моноклональное антитело, которое связывается с VEGF-A мыши и блокирует функцию VEGF-A (5 мг/кг IP, клон 2G11-2A05, закупленное из BioLegend®, San Diego, CA), включали в качестве положительной контрольной обработки и сравнительной обработки, соответственно. Исследование включало 9-10 мышей на экспериментальную группу, и его проводили слепым способом. Для оценки эффективности при постоянных и предсказуемых уровнях лекарственного средства, все обработки проводили за восемь суток до, и затем снова за одни сутки до индукции лазером, за исключением антитела против VEGF, которое инъецировали за одни сутки до и трое суток после индукции лазером. Через семь суток после лазерного повреждения, мышей подвергали анестезии, системной перфузии с использованием 0,75 мл FITC-декстрана и умерщвляли. Глаза фиксировали в формалине, получали срезы задней часть глаз, содержащей пораженные области, и погружали в реагент, препятствующий выгоранию флуоресценции, ProLong (Invitrogen). Проводили конфокальную микроскопию поврежденных областей, и получали изображения из каждой области. Измерения CNV и поврежденных областей проводили с использованием программы ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland USA). Площадь CNV нормализовали по отношению к размеру поврежденного пятна для каждого глаза, где % CNV представляет собой среднюю площадь неоваскуляризации на поврежденное пятно, рассчитанную как (площадь CNV / площадь пятна) X 100. Исследование проводили слепым способом с использованием кодированных растворов тестируемых веществ.

Результаты: Исход этого исследования показан на фиг. 20. Как показано на фиг. 20, по сравнению с группой, подвергнутой обработке носителем, для подвергнутых обработке OMS646 мышей показано подающееся оценке ингибирование CNV при всех тестируемых уровнях дозирования, с относительным уменьшением CNV в диапазоне от 29% до 50%. Для обработки антителом против VEGF показано меньшее (приблизительно на 15%) уменьшение CNV. mAb против MASP-2 мыши, происходящее из Fab2 #11, также уменьшало CNV приблизительно на 30% по сравнению с обработкой носителем (данные не представлены), что согласуется с результатами, наблюдаемыми в исследовании, проведенном на мышах MASP-2 (-/-), описанном в примере 12, в котором наблюдали уменьшение CNV на 30% через 7 суток после обработки лазером у мышей MASP-2 (-/-) по сравнению с контрольными мышами дикого типа.

Результаты этого исследования предоставляют доказательства того, что системное введение OMS646 обеспечивает эффективную терапию для лечения неоваскулярной AMD. В отличие от современных и появляющихся лекарственных средств против AMD и других офтальмологических ангиогенных заболеваний и нарушений, требующих инъекции в стекловидное тело, OMS646 является также эффективным при подкожном введении.

Можно дополнительно отметить, что ранее показано, что антитело против VEGF-A, используемое в этом исследовании (клон 2G11-2A05 из BioLegend®, San Diego, CA), уменьшают распространение сосудов в роговицу в модели на мышах индуцированного HSV-1 лимфангиогенеза роговицы при введении посредством субконъюнктивальной инъекции в концентрации 100 мкг/мл, как описано в Wuest et al. (*J Exp Med* 207:101, 2009). В другом исследовании Lu et al. (*Cancer Res* 72:2239-50, 2012), обработка антителом против VEGF (клон 2G11-2A05) мышей Ceacam 1 -/-, несущих опухоли B16, значительно уменьшало размер опухоли, так же как сосудистую сеть опухоли в модели опухоли ободочной кишки при введении IP при приблизительно 3 мг/кг дважды в неделю. С учетом данных настоящего исследования, показы-



вающих, что OMS646 является по меньшей мере настолько же эффективным, как антитело против VEGF, в уменьшении CNV при системной доставке мышам при всех тестированных уровнях дозирования, ожидают, что ингибирующее MASP-2 средство, такое как OMS646, может также являться эффективным в качестве антиангиогенного средства для использования для ингибирования зависимой от ангиогенеза злокачественной опухоли, например, такой как, зависимая от ангиогенеза злокачественная опухоль, выбранная из группы, состоящей из солидной опухоли(опухолей), передающиеся через кровь опухоли, карциноидные опухоли высокого риска и метастазы опухолей. Примерами зависимых от ангиогенеза злокачественных опухолей являются злокачественные опухоли типов, для которых одобрено лечение посредством средства против VEGF, такого как антитело против VEGF Авастин® (бевацизумаб, Genentech, CA). Например, бевацизумаб одобрен для лечения следующих зависимых от ангиогенеза злокачественных опухолей: метастазирующего колоректального рака, неплоскоклеточного немелкоклеточного рака легкого, метастазирующего почечноклеточного рака и глиобластомы.

Дополнительными примерами зависимых от ангиогенеза злокачественных опухолей являются злокачественные опухоли типов, для которых ожидают получение преимущества от лечения посредством средства против VEGF, такого как антитело против VEGF Авастин® (бевацизумаб, Genentech, CA), например, такие как любая злокачественная опухоль, для которой уже известно лечение или находится в разработке лечение с использованием ангиостатического соединения (например, антагониста VEGF), включая злокачественные опухоли на поздних стадиях, метастазирующие в печень, меланому, рак яичника, нейробластому, рак поджелудочной железы, печеночноклеточную карциному, рак эндометрия, рак предстательной железы, ангиосаркому, метастазирующую или неоперабельную ангиосаркому, рецидивирующие опухоли стромы полового тяжа яичников, рак пищевода, рак желудка, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, рецидивирующий или метастазирующий рак головы и шеи, неопластический менингит, рак шейки матки, рак тела матки, перитонеальный карциноматоз на поздних стадиях, глиосаркому, нейроэндокринную карциному, экстракраниальную саркому Юинга, острый миелоидный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, интракраниальную менингиому, саркому Капоши на поздних стадиях, мезотелиому, злокачественную опухоль желчевыводящих путей, метастазирующие карциноидные опухоли и злокачественную опухоль мочевыводящих путей на поздних стадиях. Предпочтительные злокачественные опухоли в этом контексте включают: колоректальные злокачественные опухоли, злокачественные опухоли молочной железы (включая метастазирующий рак молочной железы, воспалительную карциному молочной железы), легкого, почек, печени, пищевода, яичников, поджелудочной железы, предстательной железы и желудка, так же как глиому, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта, лимфому, меланому и карциноидные опухоли.

Ожидают также, что ингибирующее MASP-2 средство, такое как OMS646, может являться эффективным в качестве антиангиогенного средства для ингибирования зависимой от ангиогенеза доброкачественной опухоли, например, такой как, зависимая от ангиогенеза доброкачественная опухоль, выбранная из группы, состоящей из гемангиом, невринома слухового нерва, нейрофибром, трахом, карциноидных опухолей и пиогенных гранулем. Ожидают также, что ингибирующее MASP-2 средство, такое как OMS646, может являться эффективным в качестве антиангиогенного средства для использования в ингибировании ангиогенеза при AMD и других офтальмологических ангиогенных заболеваниях или нарушениях, таких как увеит, меланома глаза, неоваскуляризация роговицы, первичный птеригий, стромальный кератит HSV, индуцированный HSV-1 лимфангиогенез роговицы, пролиферативная диабетическая ретинопатия, диабетический отек желтого пятна, ретинопатия недоношенных, окклюзия вен сетчатки, отторжение трансплантата роговицы, неоваскулярная глаукома, геморрагия стекловидного тела, вторичная по отношению к пролиферативной диабетической ретинопатии, нейромиелит зрительного нерва и покраснение радужки.

С учетом данных настоящего исследования, показывающих, что OMS646 является по меньшей мере настолько же эффективным, как антитело против VEGF, в уменьшении CNV при системной доставке мышам при всех тестированных уровнях дозирования, ожидают также, что ингибирующее MASP-2 средство, такое как OMS646, может также являться эффективным в качестве антиангиогенного средства для использования для ингибирования зависимого от ангиогенеза состояния, такого как миелофиброз и наследственная геморрагическая телеангиэктазия.

Пример 17.

В этом примере описано использование линии MASP-2 (-/-) и ингибирующих MASP-2 антител для подтверждения того, что ингибирование зависимого от MASP-2 лектинового пути активации комплемента индуцирует антиангиогенный эффект в модели на животных лигирования бедренной артерии.

Уровень техники/Обоснование: С учетом неожиданных результатов, описанных в примере 16, показывающих, что человеческое mAb против MASP-2 OMS646 ингибирует CNV в модели AMD по меньшей мере в равной, если не в большей степени, чем антитело против VEGF-A, следующие исследования проводили для подтверждения того, что ангиогенез уменьшен у мышей с недостаточностью MASP-2, а также, что антитело против MASP-2, блокирующее лектиновый путь, такое как OMS646, является эффек-

тивными для использования *in vivo* в качестве ингибирующего ангиогенез средства при системном введении.

Способы.

Исследование #1. Артериогенез индуцировали у мышей MASP-2 (-/-), контрольных мышей дикого типа и мышей дикого типа, подвергнутых предварительной обработке ингибирующим антителом против MASP-2, посредством лигирования бедренной артерии, и лазерные доплеровские измерения перфузии проводили *in vivo*, чтобы наблюдать, влияет ли на процесс роста коллатеральной артерии недостаточность MASP-2. Измерения перфузии проводили до суток 21 после лигирования бедренной артерии.

Иммуногистохимию проводили на сутки 3 после лигирования бедренной артерии.

(а) В верхней части конечности, где возникает артериогенез, для исследования влияния недостаточности MASP-2 на периваскулярную инфильтрацию лейкоцитов (артериогенез сильно зависит от инфильтрации лейкоцитов, принимая во внимание, что лейкоциты обеспечивают растущие коллатеральные сосуды факторами роста, цитокинами); и

(б) В нижней части конечности, где возникает ишемия из-за лигирования бедренной артерии, для исследования тяжести ишемического повреждения ткани, инфильтрации лейкоцитов и ангиогенеза у мышей MASP-2 (-/-), у мышей дикого типа, подвергнутых обработке антителом против MASP-2, и у контрольных мышей дикого типа.

(с) Исследование экспрессии генов на уровнях РНК и белка также проводили на выделенных коллатеральных сосудах через 12 ч или 24 ч после лигирования бедренной артерии у мышей MASP-2 (-/-). У мышей дикого типа, подвергнутых обработке антителом против MASP-2, и у контрольных мышей дикого типа.

На основании антиангиогенного эффекта, описанного выше, ожидают, что ингибирование MASP-2 может предотвращать или уменьшать артериогенез в верхней части конечности на 25-50%. Кроме того, показано, что ингибирование MASP-2 уменьшает управляемый комплементом патологический ответ после ишемии на 25%-50% (Schwaeble et al., PNAS 108(18):7523-7528). Таким образом, можно также ожидать, что ингибирование MASP-2 может ингибировать васкулогенез в нижней части конечности до сходной степени.

В то время как иллюстративные варианты осуществления проиллюстрированы и описаны, следует понимать, что можно осуществлять различные изменения без отклонения от содержания и объема изобретения.

#### Список последовательностей

<110> Omeros Corporation  
University of Leicester  
Demopoulos, Gregory A.  
Schwaeble, Hans-Wilhelm  
Dudler, Thomas  
Tjoelker, Larry W.

<120> Способы ингибирования ангиогенеза у нуждающегося в этом субъекта

<130> МР.1.0239.РСТ

<150> US 62/315,857

<151> 2016-03-31

<160> 71

<170> PatentIn версии 3.5

<210> 1

<211> 725

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (27) .. (584)

<400> 1

ggccaggcca gctggacggg cacacc atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt 53  
Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu  
1 5

ctg tgt ggc tcg gtg gcc acc ccc ttg ggc ccg aag tgg cct gaa cct 101

045598

Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro  
 10 15 20 25

gtg ttc ggg cgc ctg gca tcc ccc ggc ttt cca ggg gag tat gcc aat 149  
 Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn  
 30 35 40

gac cag gag cgg cgc tgg acc ctg act gca ccc ccc ggc tac cgc ctg 197  
 Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu  
 45 50 55

cgc ctc tac ttc acc cac ttc gac ctg gag ctc tcc cac ctc tgc gag 245  
 Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu  
 60 65 70

tac gac ttc gtc aag ctg agc tcg ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg 293  
 Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu  
 75 80 85

tgc ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act 341  
 Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr  
 90 95 100 105

ttc tac tcg ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac 389  
 Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr  
 110 115 120

tcc aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag 437  
 Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu  
 125 130 135

gac att gac gag tgc cag gtg gcc ccg gga gag gcg ccc acc tgc gac 485  
 Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp  
 140 145 150

cac cac tgc cac aac cac ctg ggc ggt ttc tac tgc tcc tgc cgc gca 533  
 His His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala  
 155 160 165

ggc tac gtc ctg cac cgt aac aag cgc acc tgc tca gag cag agc ctc 581  
 Gly Tyr Val Leu His Arg Asn Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu  
 170 175 180 185

tag cctcccctgg agctccggcc tgcccagcag gtcagaagcc agagccagcc 634

tgctggcctc agctccgggt tgggctgaga tggctgtgcc ccaactccca ttcaccacc 694

atgaccccaa taataaacct ggccccaccc c 725

<210> 2  
 <211> 185  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr  
 1 5 10 15

Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser  
 20 25 30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr  
 35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe



045598

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln  
 115 120 125

Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His  
 130 135 140

Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg  
 145 150 155 160

Asn Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu  
 165 170

<210> 4  
 <211> 2460  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (22)..(2082)

<400> 4  
 ggccagctgg acgggcacac c atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt ctg 51  
 Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10  
 tgt ggc tcg gtg gcc acc ccc ttg ggc ccg aag tgg cct gaa cct gtg 99  
 Cys Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val  
 15 20 25  
 ttc ggg cgc ctg gca tcc ccc ggc ttt cca ggg gag tat gcc aat gac 147  
 Phe Gly Arg Leu Ala Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp  
 30 35 40  
 cag gag cgg cgc tgg acc ctg act gca ccc ccc ggc tac cgc ctg cgc 195  
 Gln Glu Arg Arg Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg  
 45 50 55  
 ctc tac ttc acc cac ttc gac ctg gag ctc tcc cac ctc tgc gag tac 243  
 Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr  
 60 65 70  
 gac ttc gtc aag ctg agc tcg ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg tgc 291  
 Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys  
 75 80 85 90  
 ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act ttc 339  
 Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe  
 95 100 105  
 tac tcg ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac tcc 387  
 Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser  
 110 115 120  
 aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag gac 435  
 Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp  
 125 130 135  
 att gac gag tgc cag gtg gcc ccg gga gag gcg ccc acc tgc gac cac 483  
 Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His  
 140 145 150  
 cac tgc cac aac cac ctg ggc ggt ttc tac tgc tcc tgc cgc gca ggc 531  
 His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly  
 155 160 165 170

tac gtc ctg cac cgt aac aag cgc acc tgc tca gcc ctg tgc tcc ggc	579
Tyr Val Leu His Arg Asn Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly	
175 180 185	
cag gtc ttc acc cag agg tct ggg gag ctc agc agc cct gaa tac cca	627
Gln Val Phe Thr Gln Arg Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro	
190 195 200	
cgg ccg tat ccc aaa ctc tcc agt tgc act tac agc atc agc ctg gag	675
Arg Pro Tyr Pro Lys Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu	
205 210 215	
gag ggg ttc agt gtc att ctg gac ttt gtg gag tcc ttc gat gtg gag	723
Glu Gly Phe Ser Val Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu	
220 225 230	
aca cac cct gaa acc ctg tgt ccc tac gac ttt ctc aag att caa aca	771
Thr His Pro Glu Thr Leu Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr	
235 240 245 250	
gac aga gaa gaa cat ggc cca ttc tgt ggg aag aca ttg ccc cac agg	819
Asp Arg Glu Glu His Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg	
255 260 265	
att gaa aca aaa agc aac acg gtg acc atc acc ttt gtc aca gat gaa	867
Ile Glu Thr Lys Ser Asn Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu	
270 275 280	
tca gga gac cac aca ggc tgg aag atc cac tac acg agc aca gcg cag	915
Ser Gly Asp His Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln	
285 290 295	
cct tgc cct tat ccg atg gcg cca cct aat ggc cac gtt tca cct gtg	963
Pro Cys Pro Tyr Pro Met Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val	
300 305 310	
caa gcc aaa tac atc ctg aaa gac agc ttc tcc atc ttt tgc gag act	1011
Gln Ala Lys Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr	
315 320 325 330	
ggc tat gag ctt ctg caa ggt cac ttg ccc ctg aaa tcc ttt act gca	1059
Gly Tyr Glu Leu Leu Gln Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala	
335 340 345	
gtt tgt cag aaa gat gga tct tgg gac cgg cca atg ccc gcg tgc agc	1107
Val Cys Gln Lys Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser	
350 355 360	
att gtt gac tgt ggc cct cct gat gat cta ccc agt ggc cga gtg gag	1155
Ile Val Asp Cys Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu	
365 370 375	
tac atc aca ggt cct gga gtg acc acc tac aaa gct gtg att cag tac	1203
Tyr Ile Thr Gly Pro Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr	
380 385 390	
agc tgt gaa gag acc ttc tac aca atg aaa gtg aat gat ggt aaa tat	1251
Ser Cys Glu Glu Thr Phe Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr	
395 400 405 410	
gtg tgt gag gct gat gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa aaa tca	1299
Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser	
415 420 425	
ctc cca gtc tgt gag cct gtt tgt gga cta tca gcc cgc aca aca gga	1347
Leu Pro Val Cys Glu Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly	
430 435 440	
ggg cgt ata tat gga ggg caa aag gca aaa cct ggt gat ttt cct tgg	1395

## 045598

Gly	Arg	Ile	Tyr	Gly	Gly	Gln	Lys	Ala	Lys	Pro	Gly	Asp	Phe	Pro	Trp	
		445					450					455				
caa	gtc	ctg	ata	tta	ggg	gga	acc	aca	gca	gca	ggg	gca	ctt	tta	tat	1443
Gln	Val	Leu	Ile	Leu	Gly	Gly	Thr	Thr	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Leu	Tyr	
	460					465					470					
gac	aac	tgg	gtc	cta	aca	gct	gct	cat	gcc	gtc	tat	gag	caa	aaa	cat	1491
Asp	Asn	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Ala	Val	Tyr	Glu	Gln	Lys	His	
475				480						485					490	
gat	gca	tcc	gcc	ctg	gac	att	cga	atg	ggc	acc	ctg	aaa	aga	cta	tca	1539
Asp	Ala	Ser	Ala	Leu	Asp	Ile	Arg	Met	Gly	Thr	Leu	Lys	Arg	Leu	Ser	
			495						500					505		
cct	cat	tat	aca	caa	gcc	tgg	tct	gaa	gct	ggt	ttt	ata	cat	gaa	ggg	1587
Pro	His	Tyr	Thr	Gln	Ala	Trp	Ser	Glu	Ala	Val	Phe	Ile	His	Glu	Gly	
			510					515					520			
tat	act	cat	gat	gct	ggc	ttt	gac	aat	gac	ata	gca	ctg	att	aaa	ttg	1635
Tyr	Thr	His	Asp	Ala	Gly	Phe	Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Lys	Leu	
		525					530					535				
aat	aac	aaa	gtt	gta	atc	aat	agc	aac	atc	acg	cct	att	tgt	ctg	cca	1683
Asn	Asn	Lys	Val	Val	Ile	Asn	Ser	Asn	Ile	Thr	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	
	540					545					550					
aga	aaa	gaa	gct	gaa	tcc	ttt	atg	agg	aca	gat	gac	att	gga	act	gca	1731
Arg	Lys	Glu	Ala	Glu	Ser	Phe	Met	Arg	Thr	Asp	Asp	Ile	Gly	Thr	Ala	
555					560					565					570	
tct	gga	tgg	gga	tta	acc	caa	agg	ggg	ttt	ctt	gct	aga	aat	cta	atg	1779
Ser	Gly	Trp	Gly	Leu	Thr	Gln	Arg	Gly	Phe	Leu	Ala	Arg	Asn	Leu	Met	
			575						580					585		
tat	gtc	gac	ata	ccg	att	gtt	gac	cat	caa	aaa	tgt	act	gct	gca	tat	1827
Tyr	Val	Asp	Ile	Pro	Ile	Val	Asp	His	Gln	Lys	Cys	Thr	Ala	Ala	Tyr	
			590					595					600			
gaa	aag	cca	ccc	tat	cca	agg	gga	agt	gta	act	gct	aac	atg	ctt	tgt	1875
Glu	Lys	Pro	Pro	Tyr	Pro	Arg	Gly	Ser	Val	Thr	Ala	Asn	Met	Leu	Cys	
		605					610					615				
gct	ggc	tta	gaa	agt	ggg	ggc	aag	gac	agc	tgc	aga	ggg	gac	agc	gga	1923
Ala	Gly	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Lys	Asp	Ser	Cys	Arg	Gly	Asp	Ser	Gly	
	620					625					630					
ggg	gca	ctg	gtg	ttt	cta	gat	agt	gaa	aca	gag	agg	tgg	ttt	gtg	gga	1971
Gly	Ala	Leu	Val	Phe	Leu	Asp	Ser	Glu	Thr	Glu	Arg	Trp	Phe	Val	Gly	
635					640					645					650	
gga	ata	gtg	tcc	tgg	ggg	tcc	atg	aat	tgt	ggg	gaa	gca	ggg	cag	tat	2019
Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Ser	Met	Asn	Cys	Gly	Glu	Ala	Gly	Gln	Tyr	
			655						660					665		
gga	gtc	tac	aca	aaa	ggt	att	aac	tat	att	ccc	tgg	atc	gag	aac	ata	2067
Gly	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Ile	Asn	Tyr	Ile	Pro	Trp	Ile	Glu	Asn	Ile	
			670					675					680			
att	agt	gat	ttt	taa	cttg	cg	gtg	gac	tg	cag	tca	ag	gatt	ctt	cat	2122
Ile	Ser	Asp	Phe													
		685														
gcctgtgaag	accttggcag	cgacgtggct	cgagaagcat	tcatcattac	tgtggacatg											2182
gcagttggtg	ctccacccaa	aaaaacagac	tccaggtgag	gctgctgtca	tttctccact											2242
tgccagttta	attccagcct	taccattga	ctcaagggga	cataaaccac	gagagtgaca											2302
gtcatctttg	cccaccagt	gtaatgtcac	tgctcaaatt	acatttcatt	accttaaaaa											2362

## 045598

gccagtctct tttcatactg gctgttgcca tttctgtaaa ctgcctgtcc atgctctttg 2422

tttttaaact tgttcttatt gaaaaaaaa aaaaaaaa 2460

<210> 5  
 <211> 686  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr  
 1 5 10 15

Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser  
 20 25 30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr  
 35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe  
 50 55 60

Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser  
 65 70 75 80

Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp  
 85 90 95

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser  
 100 105 110

Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr  
 115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val  
 130 135 140

Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu  
 145 150 155 160

Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn  
 165 170 175

Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln Arg  
 180 185 190

Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys Leu  
 195 200 205

Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val Ile  
 210 215 220

Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr Leu





045598

Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Asp Ala Gly  
515 520 525

Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val Ile  
530 535 540

Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu Ser  
545 550 555 560

Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu Thr  
565 570 575

Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro Ile  
580 585 590

Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr Pro  
595 600 605

Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly  
610 615 620

Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu  
625 630 635 640

Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly  
645 650 655

Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val  
660 665 670

Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe  
675 680 685

<210> 6  
<211> 671  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6

Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala  
1 5 10 15

Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp  
20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His  
35 40 45

Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu  
50 55 60

Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr  
65 70 75 80



## 045598

Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro  
 355 360 365

Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr  
 370 375 380

Phe Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp  
 385 390 395 400

Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Glu  
 405 410 415

Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly  
 420 425 430

Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Ile Leu  
 435 440 445

Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn Trp Val Leu  
 450 455 460

Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala Ser Ala Leu  
 465 470 475 480

Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln  
 485 490 495

Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Asp Ala  
 500 505 510

Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val  
 515 520 525

Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu  
 530 535 540

Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu  
 545 550 555 560

Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro  
 565 570 575

Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr  
 580 585 590

Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser  
 595 600 605

Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe  
 610 615 620

Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp  
 625 630 635 640

045598

Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys  
 645 650 655

Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe  
 660 665 670

<210> 7  
 <211> 4900  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 7  
 cctgtcctgc ctgcctggaa ctctgagcag gctggagtca tggagtcatg tcccagaatc 60  
 ccagagtcat ggaggctggg ggcaggggca ggtcactgga caaacagatc aaaggtgaga 120  
 ccagcgtagg actgcagacc aggccaggcc agctggacgg gcacaccatg aggtaggtgg 180  
 gcgccacagc ctccctgcag ggtgtggggg gggagcacag gcctgggctt caccgcccct 240  
 gccctgccc taggtgtctg accctcctgg gccttctgtg tggctcgggtg gccaccccct 300  
 taggcccga gtagcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc atcccccggc tttccagggg 360  
 agtatgcaa tgaccaggag cggcgcctgga cctgactgc accccccggc taccgcctgc 420  
 gcctctactt caccacttc gacctggagc tctcccact ctgagagtac gacttcgtca 480  
 aggtgccgtc agacgggagg gctggggttt ctcagggctc ggggggtccc aaggagttagc 540  
 cagggttcag ggacacctgg gagcaggggc caggcttggc caggagggag atcaggcctg 600  
 ggtcttgctt tcaactccctg tgacacctga cccacagct gagctcgggg gccaaagtgc 660  
 tggccacgct gtgcgggcag gagagcacag acacggagcg ggcccctggc aaggacactt 720  
 tctactcgtt gggctccagc ctggacatta ccttccgctc cgactactcc aacgagaagc 780  
 cgttcacggg gttcgaggcc ttctatgcag ccgaggggtg gccaaagagg gtctctgcaac 840  
 atctcagttc gcgcagctgg ctgtgggggt aactctgtct taggccaggc agccctgcct 900  
 tcagtttccc cacctttccc agggcagggg agaggcctct ggctgacat catccacaat 960  
 gcaaagacca aaacagccgt gacctccatt cacatgggct gagtgccaac tctgagccag 1020  
 ggatctgagg acagcatcgc ctcaagtgac gcagggactg gccgggcgcg gcagctcacg 1080  
 cctgtaattc cagcactttg ggaggccgag gctggcttga taatttgagg gtcaggagtt 1140  
 caaggccagc cagggcaaca cggtgaaact ctatctccac taaaactaca aaaattagct 1200  
 gggcgtggtg gtgcgcacct ggaatcccag ctactagggg ggctgaggca ggagaattgc 1260  
 ttgaacctgc gaggtggagg ctgcagtgaa cagagattgc accactacac tccacctggg 1320  
 cgacagacta gactccgtct caaaaaaaa aaaacaaaaa ccacgcaggg ccgagggccc 1380  
 atttacaagc tgacaaagtg gccctgcca gcgggagcgc tgcaggatgt ttgattttca 1440  
 gatcccagtc cctgcagaga ccaactgtgt gacctctggc aagtggctca atttctctgc 1500  
 tccttagaag ctgctgcaag ggttcagcgc tgtagccccg cccctgggtt ttgattgact 1560  
 ccctcatta gctgggtgac ctcgcccgga cactgaaact cccactgggt taacagaggt 1620

gatgtttgca tctttctccc agcgtctgtg ggagcttgca gcgaccctag gcctgtaagg 1680  
tgattggccc ggcaccagtc ccgcacccta gacaggacct aggcctcctc tgaggccac 1740  
tctgaggca tggatctcct gggaggagtc caggctggat cccgcctctt tccctcctga 1800  
cggcctgctt ggcctgctt cccccaga cattgacgag tgccagggtg ccccgggaga 1860  
ggcgcccacc tgcgaccacc actgccacaa ccacctgggc ggtttctact gctcctgccg 1920  
cgcaggctac gtctctgacc gtaacaagcg cacctgctca ggtgagggag gctgcctggg 1980  
ccccaacgca cctctcctg ggataccggg ggtcctcag gccattgct gctctgccca 2040  
ggggtgcgga ggcctgggc ctggacactg ggtgcttcta ggcctgctg cctccagctc 2100  
ccctctcag cctgcttcc cctctcagca gccaggctca tcagtccac cctgccctag 2160  
cactgagaact aattctaaca tcccactgtg tacctggctc cacctgggct ctgggaacc 2220  
ctcatgtagc cacgggagag tcggggatc taccctcgtt cctggactg ggtcctggt 2280  
cctgcactg ggggacgggc cagtgtctg gggcgtgggc agccccacc tgtggcgtg 2340  
acctgctcc ccgactcgg tttctcctc cggggtctc cctgcctct ctgatctctc 2400  
ttccagagca gagcctctag cctcccctgg agctccggct gccagcagg tcagaagcca 2460  
gagccaggct gctggcctca gctccgggtt gggctgagat gctgtgcccc aactcccatt 2520  
caccacat ggaccaata ataaacctgg cccacccca cctgctgccg cgtgtctctg 2580  
gggtgggagg gtcgggaggc ggtgggggc gctcctctc gcctaccctc ctcacagct 2640  
catgaacccc aggtctgtgg gagcctcctc catggggcca cacggtcctt ggcctaccc 2700  
cctgttttga agatggggca ctgaggccgg agaggggtaa ggcctcgtc gagtccagg 2760  
ccccagaggc tgagcccaga gtaacttga accacccca ttcagggtct ggcctggagg 2820  
agcctgaccc acagaggaga cacctggga gatattcatt gaggggtaat ctggtcccc 2880  
gcaaatccag gggtgattcc cactgcccc taggcacagc cacgtggaag aaggcaggca 2940  
atgttggggc tctcacttc ctgaggcct cacaactcaa atgccccca ctgcagctgg 3000  
gggtggggtg gtggtatggg atggggacca agccttctt gaaggataga gccagccca 3060  
acccccgcc ccgtggcagc agcatcacgt gttccagcga ggaaggagag caccagactc 3120  
agtcatgata actgttgcct tgaacttoca agaacagccc cagggcaagg gtcaaaacag 3180  
gggaaagggg gtgatgagag atccttctt cggatgttc tccaggaacc agggggtg 3240  
ctggtcttgg ctgggttcgg gtaggagacc catgatgaat aaactggga atcactggg 3300  
tggctgtaag ggaatttagg ggagctccga agggccctt aggctcagag agatgctcct 3360  
ctcttttccc gaattcccag ggaccagga gagtgcctt tcttctctt cctgtgtgtc 3420  
catccacccc cccccccgc cctggcagag ctggtggaac tcagtgtctt agcccctacc 3480  
ctggggttgc gactctggct caggacacca ccacgtccc tgggggtgtg agtgagggcc 3540  
tgtgcgtcc atcccagtg ctgcctgtt cagctaaagc ctcaaagcaa gagaaacccc 3600  
ctctctaagc ggcccctcag ccatcgggtg ggtcgtttgg tttctgggta ggcctcagg 3660  
gctggccacc tgcagggcc agcccaacc agggatgcag atgtcccagc cacatcctg 3720

045598

tcccagtttc ctgctcccca aggcattccac cctgctggtg gtgcgagggc tgatagaggg 3780  
cacgccaagt cactcccctg cccttccctc cttccagccc tgtgctccgg ccaggtcttc 3840  
accagaggt ctggggagct cagcagccct gaatacccac ggccgtatcc caaactctcc 3900  
agttgcactt acagatcag cctggaggag gggttcagtg tcattctgga ctttgtggag 3960  
tccttcgatg tggagacaca ccctgaaacc ctgtgtccct acgactttct caaggtctgg 4020  
ctcctgggcc cctcatcttg tcccagatcc tcccccttca gccagctgc accccctact 4080  
tcctgcagca tggccccac cacgttcccg tcaccctcgg tgaccccacc tcttcaggtg 4140  
ctctatggag gtcaaggctg gggcttcgag tacaagtgtg ggaggcagag tggggagggg 4200  
caccccaatc catggcctgg gttggcctca ttggctgtcc ctgaaatgct gaggaggtgg 4260  
gttacttccc tccgccagg ccagaccag gcagctgctc ccagctttc atgagcttct 4320  
ttctcagatt caaacagaca gagaagaaca tggccattc tgtgggaaga cattgcccga 4380  
caggattgaa acaaaaagca acacggtgac catcaccttt gtcacagatg aatcaggaga 4440  
ccacacaggg tggaaatcc actacacgag cacagtgagc aagtgggctc agatccttgg 4500  
tggaaagcga gagctgcctc tctctggagt gcaaggagct gtagagtgta gggctcttct 4560  
gggcaggact aggaagggac accaggttta gtggtgctga ggtctgagggc agcagcttct 4620  
aaggggaagc acccgtgcc tcctcagcag caccagcat cttcaccact cattcttcaa 4680  
ccaccattc accatcact catcttttac ccaccaccc tttgccactc atccttctgt 4740  
ccctcatcct tccaaccatt catcaatcac ccaccatcc atcctttgcc acacaacat 4800  
ccaccattc ttctacctac ccatoctatc catccatcct tctatcagca tccttctacc 4860  
accatcctt cgttcggta tccatcatca tccatccatc 4900

<210> 8  
<211> 136  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr  
1 5 10 15

Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser  
20 25 30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr  
35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe  
50 55 60

Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser  
65 70 75 80

Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp  
85 90 95

## 045598

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser  
 100 105 110

Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr  
 115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala  
 130 135

<210> 9  
 <211> 181  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr  
 1 5 10 15

Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser  
 20 25 30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr  
 35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe  
 50 55 60

Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser  
 65 70 75 80

Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp  
 85 90 95

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser  
 100 105 110

Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr  
 115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val  
 130 135 140

Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu  
 145 150 155 160

Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn  
 165 170 175

Lys Arg Thr Cys Ser  
 180

<210> 10



## 045598

<211> 293  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr  
 1 5 10 15

Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser  
 20 25 30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr  
 35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe  
 50 55 60

Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser  
 65 70 75 80

Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp  
 85 90 95

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser  
 100 105 110

Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr  
 115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val  
 130 135 140

Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu  
 145 150 155 160

Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn  
 165 170 175

Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln Arg  
 180 185 190

Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys Leu  
 195 200 205

Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val Ile  
 210 215 220

Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr Leu  
 225 230 235 240

Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His Gly  
 245 250 255

045598

Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser Asn  
 260 265 270

Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr Gly  
 275 280 285

Trp Lys Ile His Tyr  
 290

<210> 11  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys  
 1 5 10 15

Asp His His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg  
 20 25 30

Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn Lys  
 35 40

<210> 12  
 <211> 242  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Ile Tyr Gly Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val  
 1 5 10 15

Leu Ile Leu Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn  
 20 25 30

Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala  
 35 40 45

Ser Ala Leu Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His  
 50 55 60

Tyr Thr Gln Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr  
 65 70 75 80

His Asp Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn  
 85 90 95

Lys Val Val Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys  
 100 105 110

Glu Ala Glu Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly  
 115 120 125

045598

Trp Gly Leu Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val  
130 135 140

Asp Ile Pro Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys  
145 150 155 160

Pro Pro Tyr Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly  
165 170 175

Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala  
180 185 190

Leu Val Phe Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile  
195 200 205

Val Ser Trp Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val  
210 215 220

Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser  
225 230 235 240

Asp Phe

<210> 13  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 13

Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ala Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu  
1 5 10 15

<210> 14  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 14

Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu  
1 5 10 15

<210> 15  
<211> 43  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 15

## 045598

Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp  
 1 5 10 15

Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser  
 20 25 30

Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln  
 35 40

<210> 16  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетическая

<400> 16

Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn  
 1 5

<210> 17  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетическая

<400> 17

Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr  
 1 5 10 15

Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe  
 20 25

<210> 18  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетическая

<400> 18

Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly  
 1 5

<210> 19  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетическая

<400> 19

Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys  
 1 5 10 15

## 045598

Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val  
 20 25

<210> 20  
 <211> 960  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (51)..(797)

<400> 20  
 attaactgag attaaccttc cctgagtttt ctcacaccaa ggtgaggacc atg tcc 56  
 Met Ser  
 1

ctg ttt cca tca ctc cct ctc ctt ctc ctg agt atg gtg gca gcg tct 104  
 Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ser Met Val Ala Ala Ser  
 5 10 15

tac tca gaa act gtg acc tgt gag gat gcc caa aag acc tgc cct gca 152  
 Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys Pro Ala  
 20 25 30

gtg att gcc tgt agc tct cca ggc atc aac ggc ttc cca ggc aaa gat 200  
 Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly Lys Asp  
 35 40 45 50

ggg cgt gat ggc acc aag gga gaa aag ggg gaa cca ggc caa ggg ctc 248  
 Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln Gly Leu  
 55 60 65

aga ggc tta cag ggc ccc cct gga aag ttg ggg cct cca gga aat cca 296  
 Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly Asn Pro  
 70 75 80

ggg cct tct ggg tca cca gga cca aag ggc caa aaa gga gac cct gga 344  
 Gly Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp Pro Gly  
 85 90 95

aaa agt ccg gat ggt gat agt agc ctg gct gcc tca gaa aga aaa gct 392  
 Lys Ser Pro Asp Gly Asp Ser Ser Leu Ala Ala Ser Glu Arg Lys Ala  
 100 105 110

ctg caa aca gaa atg gca cgt atc aaa aag tgg ctc acc ttc tct ctg 440  
 Leu Gln Thr Glu Met Ala Arg Ile Lys Lys Trp Leu Thr Phe Ser Leu  
 115 120 125 130

ggc aaa caa gtt ggg aac aag ttc ttc ctg acc aat ggt gaa ata atg 488  
 Gly Lys Gln Val Gly Asn Lys Phe Phe Leu Thr Asn Gly Glu Ile Met  
 135 140 145

acc ttt gaa aaa gtg aag gcc ttg tgt gtc aag ttc cag gcc tct gtg 536  
 Thr Phe Glu Lys Val Lys Ala Leu Cys Val Lys Phe Gln Ala Ser Val  
 150 155 160

gcc acc ccc agg aat gct gca gag aat gga gcc att cag aat ctc atc 584  
 Ala Thr Pro Arg Asn Ala Ala Glu Asn Gly Ala Ile Gln Asn Leu Ile  
 165 170 175

aag gag gaa gcc ttc ctg ggc atc act gat gag aag aca gaa ggg cag 632  
 Lys Glu Glu Ala Phe Leu Gly Ile Thr Asp Glu Lys Thr Glu Gly Gln  
 180 185 190

ttt gtg gat ctg aca gga aat aga ctg acc tac aca aac tgg aac gag 680

045598

Phe Val Asp Leu Thr Gly Asn Arg Leu Thr Tyr Thr Asn Trp Asn Glu  
 195 200 205 210

ggg gaa ccc aac aat gct ggt tct gat gaa gat tgt gta ttg cta ctg 728  
 Gly Glu Pro Asn Asn Ala Gly Ser Asp Glu Asp Cys Val Leu Leu Leu  
 215 220 225

aaa aat ggc cag tgg aat gac gtc ccc tgc tcc acc tcc cat ctg gcc 776  
 Lys Asn Gly Gln Trp Asn Asp Val Pro Cys Ser Thr Ser His Leu Ala  
 230 235 240

gtc tgt gag ttc cct atc tga agggtcatat cactcaggcc ctccttgtct 827  
 Val Cys Glu Phe Pro Ile  
 245

ttttactgca acccacagggc ccacagtatg cttgaaaaga taaattatat caatttcctc 887

atatccagta ttgttccttt tgtgggcaat cactaaaaat gatcactaac agcaccaaca 947

aagcaataat agt 960

<210> 21  
 <211> 248  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Met Ser Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ser Met Val Ala  
 1 5 10 15

Ala Ser Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys  
 20 25 30

Pro Ala Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly  
 35 40 45

Lys Asp Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln  
 50 55 60

Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly  
 65 70 75 80

Asn Pro Gly Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp  
 85 90 95

Pro Gly Lys Ser Pro Asp Gly Asp Ser Ser Leu Ala Ala Ser Glu Arg  
 100 105 110

Lys Ala Leu Gln Thr Glu Met Ala Arg Ile Lys Lys Trp Leu Thr Phe  
 115 120 125

Ser Leu Gly Lys Gln Val Gly Asn Lys Phe Phe Leu Thr Asn Gly Glu  
 130 135 140

Ile Met Thr Phe Glu Lys Val Lys Ala Leu Cys Val Lys Phe Gln Ala  
 145 150 155 160

Ser Val Ala Thr Pro Arg Asn Ala Ala Glu Asn Gly Ala Ile Gln Asn



<212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетическая

<220>  
 <221> НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ ПРИЗНАК  
 <222> (9)..(15)  
 <223> Где X в положениях 9 и 15 представляет собой гидроксипролин

<400> 24

Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly Lys Leu Gly Pro Xaa Gly  
 1 5 10 15

<210> 25  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетическая

<220>  
 <221> НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ ПРИЗНАК  
 <222> (3)..(27)  
 <223> Где X в положениях 3, 6, 15, 21, 24, 27 представляет собой гидроксипролин

<400> 25

Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly  
 1 5 10 15

Lys Leu Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa  
 20 25

<210> 26  
 <211> 53  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Синтетическая

<220>  
 <221> неопределенный признак  
 <222> (26)..(26)  
 <223> Xaa может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>  
 <221> неопределенный признак  
 <222> (32)..(32)  
 <223> Xaa может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>  
 <221> неопределенный признак  
 <222> (35)..(35)  
 <223> Xaa может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>  
 <221> неопределенный признак  
 <222> (41)..(41)



045598

<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<220>

<221> неопределенный признак

<222> (50)..(50)

<223> Хаа может представлять собой любую природную аминокислоту

<400> 26

Gly Lys Asp Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly  
1 5 10 15

Gln Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly Lys Leu Gly Pro Xaa  
20 25 30

Gly Asn Xaa Gly Pro Ser Gly Ser Xaa Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly  
35 40 45

Asp Xaa Gly Lys Ser  
50

<210> 27

<211> 33

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<220>

<221> НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ ПРИЗНАК

<222> (3)..(33)

<223> Где X в положениях 3, 6, 12, 18, 21, 30, 33 представляет собой гидроксипролин

<400> 27

Gly Ala Xaa Gly Ser Xaa Gly Glu Lys Gly Ala Xaa Gly Pro Gln Gly  
1 5 10 15

Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Lys Met Gly Pro Lys Gly Glu Xaa Gly Asp  
20 25 30

Хаа

<210> 28

<211> 45

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<220>

<221> НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ ПРИЗНАК

<222> (3)..(45)

<223> Где X в положениях 3, 6, 9, 27, 30, 36, 42, 45 представляет собой гидроксипролин

<400> 28

045598

Gly Cys Xaa Gly Leu Xaa Gly Ala Xaa Gly Asp Lys Gly Glu Ala Gly  
1 5 10 15

Thr Asn Gly Lys Arg Gly Glu Arg Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Lys  
20 25 30

Ala Gly Pro Xaa Gly Pro Asn Gly Ala Xaa Gly Glu Xaa  
35 40 45

<210> 29  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 29

Leu Gln Arg Ala Leu Glu Ile Leu Pro Asn Arg Val Thr Ile Lys Ala  
1 5 10 15

Asn Arg Pro Phe Leu Val Phe Ile  
20

<210> 30  
<211> 559  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<400> 30  
atgaggctgc tgaccctect gggccttctg tgtggctcgg tggccacccc cttgggcccg 60  
aagtggcctg aacctgtgtt cgggcgcctg gcacccccg gctttccagg ggagtatgcc 120  
aatgaccagg agcggcgctg gaccctgact gcacccccg gctaccgctt gcgcctctac 180  
ttcaccact tgcacctgga gctctcccac ctctgcgagt acgacttcgt caagctgagc 240  
tcggggggcca agtgctggc cacgctgtgc gggcaggaga gcacagacac ggagcggggc 300  
cctggcaagg aacttttcta ctgcctgggc tccagcctgg acattacctt ccgctccgac 360  
tactccaacg agaagccgtt cacggggttc gaggccttct atgcagccga ggacattgac 420  
gagtgccagg tggccccggg agaggcgccc acctgcgacc accactgcca caaccacctg 480  
ggcggtttct actgctcctg ccgcgcaggc tacgtcctgc accgtaacaa gcgcacctgc 540  
tcagccctgt gctccggcc 559

<210> 31  
<211> 34  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 31  
cgggcsacacc atgaggctgc tgaccctect gggc 34

<210> 32  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Синтетическая  
  
 <400> 32  
 gacattacst tccgctccga ctccaacgag aag 33

<210> 33  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Синтетическая  
  
 <400> 33  
 agcagccctg aataccsacg gccgtatccc aaa 33

<210> 34  
 <211> 26  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Синтетическая  
  
 <400> 34  
 cgggatccat gaggtgctg accctc 26

<210> 35  
 <211> 19  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Синтетическая  
  
 <400> 35  
 ggaattccsta ggctgcata 19

<210> 36  
 <211> 19  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Синтетическая  
  
 <400> 36  
 ggaattccsta cagggcgct 19

<210> 37  
 <211> 19  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Синтетическая  
  
 <400> 37  
 ggaattccsta gtagtggat 19

<210> 38  
 <211> 25  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Синтетическая  
  
 <400> 38  
 tgcggccgct gtagtgctg tcttt 25

<210> 39  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Синтетическая  
  
 <400> 39  
 ggaattcaact cgttattctc gga 23

<210> 40  
 <211> 17  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Синтетическая  
  
 <400> 40  
 tccgagaata acgagtg 17

<210> 41  
 <211> 29  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Синтетическая  
  
 <400> 41  
 cattgaaagc tttgggtag aagttgttc 29

<210> 42  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Синтетическая  
  
 <400> 42  
 cgcggccgca gctgctcaga gtgtaga 27

<210> 43  
 <211> 28  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Синтетическая

<400> 43  
cggtaagctt cactggctca gggaaata 28

<210> 44  
<211> 37  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 44  
aagaagcttg ccgscaccat ggattggctg tggaact 37

<210> 45  
<211> 31  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 45  
cgggatcctc aaactttctt gtccaccttg g 31

<210> 46  
<211> 36  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 46  
aagaaagctt gccgscacca tgttctcact agctct 36

<210> 47  
<211> 26  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 47  
cgggatcctt ctccctctaa cactct 26

<210> 48  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 48

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
1 5

<210> 49  
<211> 4960  
<212> ДНК  
<213> Homo Sapiens

<400> 49  
 ccggacgtgg tggcgcacatgc ctgtaatccc agctactcgg gaggctgagg caggagaatt 60  
 gctcgaaccc cggaggcaga ggtttggtgg ctcacacctg taatcccagc actttgcgag 120  
 gctgaggcag gtgcatcgct ttggctcagg agttcaagac cagcctgggc aacacagga 180  
 gacccccatc tctacaaaaa aaaaaaaca atataaaggg gataaaaaaa aaaaaagac 240  
 aagacatgaa tccatgagga cagagtgtgg aagaggaagc agcagcctca aagttctgga 300  
 agctggaaga acagataaac aggtgtgaaa taactgcctg gaaagcaact tctttttttt 360  
 tttttttttt tttgagggtgg agtctcactc tgtcgtccag gctggagtgc agtggtgca 420  
 tctcggatca ctgcaacctc cgctcccag gctcaagcaa ttctcctgcc tcagcctccc 480  
 gagtagctgg gattataagt gcgcgctgcc acacctggat gatttttgta ttttttagtag 540  
 agatgggatt tcaccatggt ggtcaggctg gtctcaaact cccaacctcg tgatccacc 600  
 accttggcct cccaaagtgc tgggattaca ggtataagcc accgagccca gccaaaagcg 660  
 acttctaagc ctgcaagga atcggaatt ggtggacca ggtccttctg acagggttta 720  
 agaaattagc cagcctgagg ctgggcacgg tggctcacac ctgtaatccc agcactttgg 780  
 gaggctaagg caggtggatc acctgagggc aggagttaa gaccagcctg accaacatgg 840  
 agaaacccca tcctaccaa aaataaaaaa ttagccagggt gtggtggtgc tcgcctgtaa 900  
 tcccagctac ttgggaggct gaggtgggag gattgcttga acacaggaag tagaggtgc 960  
 agtgagctat gattgcagca ctgcaactgaa gccggggcaa cagaacaaga tccaaaaaaa 1020  
 agggaggggt gaggggcaga gccaggattt gttccaggc tgttgttacc taggtccgac 1080  
 tcctggctcc cagagcagcc tgtcctgctt gcctggaact ctgagcaggc tggagtcatg 1140  
 gagtcgatcc ccagaatccc agagtcaagg aggtggggg caggggcagg tcaactggaca 1200  
 aacagatcaa aggtgagacc agcgtagggc tgcaagacc gccaggccag ctggacgggc 1260  
 acaccatgag gtaggtgggc gccacagcc tcctgcagg gtgtgggggtg ggagcacagg 1320  
 cctgggcoct caccgcoct gcctgccca taggtgctg acctcctgg gccttctgtg 1380  
 tggctcgggt gccaccccoct tgggcccga gtggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc 1440  
 atccccggc tttccagggg agtatgcaa tgaccaggag cggcgtgga cctgactgc 1500  
 accccccggc taccgctgc gcctctact caccacttc gacctggagc tctcccact 1560  
 ctgcgagtac gacttcgtca aggtgccgtc aggacgggag ggtgggggtt tctcagggtc 1620  
 ggggggtccc caaggagtag ccagggttca gggacacctg ggagcagggg ccaggcttgg 1680  
 ccaggagga gatcaggcct gggctctgcc ttcactcoct gtgacacctg accccacagc 1740  
 tgagctcggg ggccaagggt ctggccacgc tgtgcgggca ggagagcaca gacacggagc 1800  
 gggcccctgg caaggacact ttctactgc tgggtccag cctggacatt acctccgct 1860  
 ccgactactc caacgagaag ccgttcacgg ggttcgaggc cttctatgca gccgaggggtg 1920  
 agccaagagg ggtcctgcaa catctcagtc tgcgcagctg gctgtggggg taactctgtc 1980  
 ttaggccagg cagccctgcc ttcagtttcc ccaccttcc cagggcaggg gagaggcctc 2040

tggcctgaca tcatccacaa tgcaaagacc aaaacagccg tgacctccat tcacatgggc 2100  
 tgagtgccaa ctctgagcca gggatctgag gacagcatcg cctcaagtga cgcagggact 2160  
 ggccggggcgc agcagctcac gctgttaatt ccagcacttt gggaggccga ggctggctga 2220  
 tcatttgagg tcaggagttc aaggccagcc agggcaacac ggtgaaactc tatctccact 2280  
 aaaactacaa aaattagctg ggcgtgggtg tgcgcacctg gaatcccagc tactagggag 2340  
 gctgaggcag gagaattgct tgaacctgcg aggtggaggc tgcagtgaac agagattgca 2400  
 ccactacact ccagcctggg cgacagagct agactccgtc tcaaaaaaca aaaaaacaaa 2460  
 acgacgcagg ggccgagggc cccatttaca gctgacaaag tggggccctg ccagcgggag 2520  
 cgctgccagg atgtttgatt tcagatccca gtcctcgcag agaccaactg tgtgacctct 2580  
 ggcaagtggc tcaatttctc tgcctcttag gaagctgctg caagggttca gcgctgtagc 2640  
 cccgccccct gggtttgatt gactccccctc attagctggg tgacctcggg ccggacactg 2700  
 aaactcccac tggtttaaca gaggtgatgt ttgcatcttt ctcccagcgc tgcctgggagc 2760  
 ttgcagcgac cctaggcctg taaggtgatt ggccccgcac cagtcccgca ccctagacag 2820  
 gacgaggcct cctctgaggt cactctgag gtcattggatc tcctgggagg agtccaggct 2880  
 ggatcccgcg tctttccctc ctgacggcct gcctggccct gcctctcccc cagacattga 2940  
 cgagtgccag gtggccccgg gagaggcgcc cacctcgcag caccactgcc acaaccacct 3000  
 gggcggtttc tactgctcct gccgcgagc ctacgtcctg caccgtaaca agcgcacctg 3060  
 ctgagccctg tgcctcggcc aggtcttcac ccagaggtct ggggagctca gcagccctga 3120  
 ataccacagg ccgtatccca aactctccag ttgcacttac agcatcagcc tggaggaggg 3180  
 gttcagtgtc attctggact ttgtggagtc cttcgatgtg gagacacacc ctgaaacct 3240  
 gtgtccctac gactttctca agattcaaac agacagagaa gaacatggcc cattctgtgg 3300  
 gaagacattg cccacagga ttgaaacaaa aagcaacacg gtgaccatca ctttgtcac 3360  
 agatgaatca ggagaccaca caggctggaa gatccactac acgagcacag cgcacgcttg 3420  
 cccttatccg atggcgccac ctaatggcca cgtttcacct gtgcaagcca aatacatcct 3480  
 gaaagacagc ttctccatct tttgcgagac tggctatgag cttctgcaag gtcacttgcc 3540  
 cctgaaatcc tttactgcag tttgtcagaa agatggatct tgggaccggc caatgcccgc 3600  
 gtgcagcatt gttgactgtg gccctcctga tgatctacc agtggccgag tggagtacat 3660  
 cacaggtcct ggagtgacca cctacaaagc tgtgattcag tacagctgtg aagagacct 3720  
 ctacacaatg aaagtgaatg atggtaaata tgtgtgtgag gctgatggat tctggacgag 3780  
 ctccaaagga gaaaaatcac tcccagtctg tgagcctggt tgtggactat cagcccgcac 3840  
 aacaggaggg cgtatatatg gagggcaaaa ggcaaacct ggtgatthtc cttggcaagt 3900  
 cctgatatta ggtggaacca cagcagcagg tgactthta tatgacaact gggcctaac 3960  
 agctgctcat gccgtctatg agcaaaaaa tgatgcatcc gccctggaca ttcgaatggg 4020  
 caccctgaaa agactatcac ctattatac acaagcctgg tctgaagctg tttttataca 4080  
 tgaaggttat actcatgatg ctggctttga caatgacata gcactgatta aattgaataa 4140

045598

caaagttgta atcaatagca acatcacgcc tatttgtctg ccaagaaaag aagctgaatc 4200  
ctttatgagg acagatgaca ttggaactgc atctggatgg ggattaacct aaaggggttt 4260  
tcttgctaga aatctaattgt atgtcgacat accgattggt gaccatcaaa aatgtactgc 4320  
tgcataatgaa aagccacct atccaagggg aagtgtact gctaacaatgc tttgtgctgg 4380  
cttagaaagt gggggcaagg acagctgcag aggtgacagc ggagggggcac tgggtgtttct 4440  
agatagtgaa acagagaggt ggtttgtggg aggaatagtg tcctgggggtt ccatgaattg 4500  
tgggggaagca ggtcagtatg gagtctacac aaaagttatt aactatattc cctggatcga 4560  
gaacataatt agtgatTTTT aacttgcgtg tctgcagtca aggattcttc attttagaa 4620  
atgcctgtga agacctggc agcgacgtgg ctcgagaagc attcatcatt actgtggaca 4680  
tggcagttgt tgcctccacc aaaaaaacag actccaggtg aggctgctgt catttctcca 4740  
cttgccagtt taattccagc cttaccatt gactcaaggg gacataaacc acgagagtga 4800  
cagtcattct tgcaccacca gtgtaatgtc actgctcaaa ttacatttca ttacctaaa 4860  
aagccagtct ctttctacac tggctgttgg catttctgta aactgcctgt ccatgctctt 4920  
tgTTTTTaaa cttgttctta ttgaaaaaaa aaaaaaaaaa 4960

<210> 50  
<211> 2090  
<212> ДНК  
<213> МЫШИНАЯ

<220>  
<221> CDS  
<222> (33)..(2090)

<400> 50  
ggcgtggac tgcagagcta tgggtggcaca cc atg agg cta ctc atc ttc ctg 53  
Met Arg Leu Leu Ile Phe Leu  
1 5  
  
ggt ctg ctg tgg agt ttg gtg gcc aca ctt ctg ggt tca aag tgg cct 101  
Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro  
10 15 20  
  
gaa cct gta ttc ggg cgc ctg gtg tcc cct ggc ttc cca gag aag tat 149  
Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val Ser Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr  
25 30 35  
  
gct gac cat caa gat cga tcc tgg aca ctg act gca ccc cct ggc tac 197  
Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr  
40 45 50 55  
  
cgc ctg cgc ctc tac ttc acc cac ttt gac ctg gaa ctc tct tac cgc 245  
Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser Tyr Arg  
60 65 70  
  
tgc gag tat gac ttt gtc aag ttg agc tca ggg acc aag gtg ctg gcc 293  
Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala  
75 80 85  
  
aca ctg tgt ggg cag gag agt aca gac act gag cag gca cct ggc aat 341  
Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn  
90 95 100  
  
gac acc ttc tac tca ctg ggt ccc agc cta aag gtc acc ttc cac tcc 389  
Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser



## 045598

105		110		115	
gac tac tcc aat gag aag ccg ttc aca ggg ttt gag gcc ttc tat gca					437
Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala					
120		125		130	135
gcg gag gat gtg gat gaa tgc aga gtg tct ctg gga gac tca gtc cct					485
Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Val Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro					
		140		145	150
tgt gac cat tat tgc cac aac tac ttg ggc ggc tac tat tgc tcc tgc					533
Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys					
		155		160	165
aga gcg ggc tac att ctc cac cag aac aag cac acg tgc tca gcc ctt					581
Arg Ala Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu					
		170		175	180
tgt tca ggc cag gtg ttc aca gga aga tct ggg tat ctc agt agc cct					629
Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly Arg Ser Gly Tyr Leu Ser Ser Pro					
		185		190	195
gag tac ccg cag cca tac ccc aag ctc tcc agc tgc acc tac agc atc					677
Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile					
200		205		210	215
cgc ctg gag gac ggc ttc agt gtc atc ctg gac ttc gtg gag tcc ttc					725
Arg Leu Glu Asp Gly Phe Ser Val Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe					
		220		225	230
gat gtg gag acg cac cct gaa gcc cag tgc ccc tat gac tcc ctc aag					773
Asp Val Glu Thr His Pro Glu Ala Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys					
		235		240	245
att caa aca gac aag ggg gaa cac ggc cca ttt tgt ggg aag acg ctg					821
Ile Gln Thr Asp Lys Gly Glu His Gln Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu					
		250		255	260
cct ccc agg att gaa act gac agc cac aag gtg acc atc acc ttt gcc					869
Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser His Lys Val Thr Ile Thr Phe Ala					
		265		270	275
act gac gag tcg ggg aac cac aca ggc tgg aag ata cac tac aca agc					917
Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser					
280		285		290	295
aca gca cgg ccc tgc cct gat cca acg gcg cca cct aat ggc agc att					965
Thr Ala Arg Pro Cys Pro Asp Pro Thr Ala Pro Pro Asn Gly Ser Ile					
		300		305	310
tca cct gtg caa gcc acg tat gtc ctg aag gac agg ttt tct gtc ttc					1013
Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu Lys Asp Arg Phe Ser Val Phe					
		315		320	325
tgc aag aca ggc ttc gag ctt ctg caa ggt tct gtc ccc ctg aaa tca					1061
Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser					
		330		335	340
ttc act gct gtc tgt cag aaa gat gga tct tgg gac cgg ccg atg cca					1109
Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro					
		345		350	355
gag tgc agc att att gat tgt ggc cct ccc gat gac cta ccc aat ggc					1157
Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly					
360		365		370	375
cat gtg gac tat atc aca ggc cct caa gtg act acc tac aaa gct gtg					1205
His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Gln Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val					
		380		385	390

## 045598

att cag tac agc tgt gaa gag act ttc tac aca atg agc agc aat ggt 1253  
Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly  
395 400 405

aaa tat gtg tgt gag gct gat gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa 1301  
Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu  
410 415 420

aaa ctc ccc ccg gtt tgt gag cct gtt tgt ggg ctg tcc aca cac act 1349  
Lys Leu Pro Pro Val Cys Glu Pro Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr  
425 430 435

ata gga gga cgc ata gtt gga ggg cag cct gca aag cct ggt gac ttt 1397  
Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe  
440 445 450 455

cct tgg caa gtc ttg ttg ctg ggt caa act aca gca gca gca ggt gca 1445  
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly Gln Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala  
460 465 470

ctt ata cat gac aat tgg gtc cta aca gcc gct cat gct gta tat gag 1493  
Leu Ile His Asp Asn Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu  
475 480 485

aaa aga atg gca gcg tcc tcc ctg aac atc cga atg ggc atc ctc aaa 1541  
Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu Asn Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys  
490 495 500

agg ctc tca cct cat tac act caa gcc tgg ccc gag gaa atc ttt ata 1589  
Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln Ala Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile  
505 510 515

cat gaa ggc tac act cac ggt gct ggt ttt gac aat gat ata gca ttg 1637  
His Glu Gly Tyr Thr His His Gly Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu  
520 525 530 535

att aaa ctc aag aac aaa gtc aca atc aac gga agc atc atg cct gtt 1685  
Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile Asn Gly Ser Ile Met Pro Val  
540 545 550

tgc cta ccg cga aaa gaa gct gca tcc tta atg aga aca gac ttc act 1733  
Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser Leu Met Arg Thr Asp Phe Thr  
555 560 565

gga act gtg gct ggc tgg ggg tta acc cag aag ggg ctt ctt gct aga 1781  
Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr Gln Lys Gly Leu Leu Ala Arg  
570 575 580

aac cta atg ttt gtg gac ata cca att gct gac cac caa aaa tgt acc 1829  
Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile Ala Asp His Gln Lys Cys Thr  
585 590 595

acc gtg tat gaa aag ctc tat cca gga gta aga gta agc gct aac atg 1877  
Thr Val Tyr Glu Lys Leu Tyr Pro Gly Val Arg Val Ser Ala Asn Met  
600 605 610 615

ctc tgt gct ggc tta gag act ggt ggc aag gac agc tgc aga ggt gac 1925  
Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp  
620 625 630

agt ggg ggg gca tta gtg ttt cta gat aat gag aca cag cga tgg ttt 1973  
Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe  
635 640 645

gtg gga gga ata gtt tcc tgg ggt tcc att aat tgt ggg gcg gca ggc 2021  
Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly  
650 655 660

cag tat ggg gtc tac aca aaa gtc atc aac tat att ccc tgg aat gag 2069  
Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu



## 045598

Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Ala Gln  
 225 230 235 240

Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Gly Glu His Gly  
 245 250 255

Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser His  
 260 265 270

Lys Val Thr Ile Thr Phe Ala Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr Gly  
 275 280 285

Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Arg Pro Cys Pro Asp Pro Thr  
 290 295 300

Ala Pro Pro Asn Gly Ser Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu  
 305 310 315 320

Lys Asp Arg Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu Gln  
 325 330 335

Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly  
 340 345 350

Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro  
 355 360 365

Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Gln  
 370 375 380

Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe  
 385 390 395 400

Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe  
 405 410 415

Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Leu Pro Pro Val Cys Glu Pro Val  
 420 425 430

Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly Gln  
 435 440 445

Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly Gln  
 450 455 460

Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asn Trp Val Leu Thr  
 465 470 475 480

Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu Asn  
 485 490 495

Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln Ala  
 500 505 510

045598

Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly  
515 520 525

Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile  
530 535 540

Asn Gly Ser Ile Met Pro Val Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser  
545 550 555 560

Leu Met Arg Thr Asp Phe Thr Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr  
565 570 575

Gln Lys Gly Leu Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile  
580 585 590

Ala Asp His Gln Lys Cys Thr Thr Val Tyr Glu Lys Leu Tyr Pro Gly  
595 600 605

Val Arg Val Ser Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly Gly  
610 615 620

Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp  
625 630 635 640

Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser  
645 650 655

Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile  
660 665 670

Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu Asn Ile Ile Ser Asn Phe  
675 680 685

<210> 52  
<211> 670  
<212> PRT  
<213> МЫШИНАЯ

<400> 52

Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val  
1 5 10 15

Ser Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp  
20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His  
35 40 45

Phe Asp Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu  
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr



## 045598

Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro  
 355 360 365

Gln Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr  
 370 375 380

Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly  
 385 390 395 400

Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Leu Pro Pro Val Cys Glu Pro  
 405 410 415

Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly  
 420 425 430

Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly  
 435 440 445

Gln Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asn Trp Val Leu  
 450 455 460

Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu  
 465 470 475 480

Asn Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln  
 485 490 495

Ala Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala  
 500 505 510

Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr  
 515 520 525

Ile Asn Gly Ser Ile Met Pro Val Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala  
 530 535 540

Ser Leu Met Arg Thr Asp Phe Thr Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu  
 545 550 555 560

Thr Gln Lys Gly Leu Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro  
 565 570 575

Ile Ala Asp His Gln Lys Cys Thr Thr Val Tyr Glu Lys Leu Tyr Pro  
 580 585 590

Gly Val Arg Val Ser Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly  
 595 600 605

Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu  
 610 615 620

Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly







## 045598

465	470	475	
aca gcg gct cat gct gta tat ggg aaa aca gag gcg atg tcc tcc ctg Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu 480 485 490			1491
gac atc cgc atg ggc atc ctc aaa agg ctc tcc ctc att tac act caa Asp Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln 495 500 505 510			1539
gcc tgg cca gag gct gtc ttt atc cat gaa ggc tac act cac gga gct Ala Trp Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala 515 520 525			1587
ggt ttt gac aat gat ata gca ctg att aaa ctc aag aac aaa gtc aca Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr 530 535 540			1635
atc aac aga aac atc atg ccg att tgt cta cca aga aaa gaa gct gca Ile Asn Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala 545 550 555			1683
tcc tta atg aaa aca gac ttc gtt gga act gtg gct ggc tgg ggg tta Ser Leu Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu 560 565 570			1731
acc cag aag ggg ttt ctt gct aga aac cta atg ttt gtg gac ata cca Thr Gln Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro 575 580 585 590			1779
att gtt gac cac caa aaa tgt gct act gcg tat aca aag cag ccc tac Ile Val Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr 595 600 605			1827
cca gga gca aaa gtg act gtt aac atg ctc tgt gct ggc cta gac cgc Pro Gly Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg 610 615 620			1875
ggt ggc aag gac agc tgc aga ggt gac agc gga ggg gca tta gtg ttt Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe 625 630 635			1923
cta gac aat gaa aca cag aga tgg ttt gtg gga gga ata gtt tcc tgg Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp 640 645 650			1971
ggt tct att aac tgt ggg ggg tca gaa cag tat ggg gtc tac acg aaa Gly Ser Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys 655 660 665 670			2019
gtc acg aac tat att ccc tgg att gag aac ata ata aat aat ttc taa Val Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe 675 680 685			2067
tttgcaaaaa aaaaaaaaaa aaaa			2091
<210> 54			
<211> 685			
<212> PRT			
<213> Крысиная			
<400> 54			
Met Arg Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr 1 5 10 15			
Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val Ser 20 25 30			

045598

Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser Trp Thr  
 35 40 45  
 Leu Thr Ala Pro Pro Gly Phe Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe  
 50 55 60  
 Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp  
 85 90 95  
 Thr Glu Arg Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro Ser  
 100 105 110  
 Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr  
 115 120 125  
 Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Thr  
 130 135 140  
 Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu  
 145 150 155 160  
 Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn  
 165 170 175  
 Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly Arg  
 180 185 190  
 Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys Leu  
 195 200 205  
 Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser Ile Thr  
 210 215 220  
 Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu Ala Gln  
 225 230 235 240  
 Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Arg Glu Tyr Gly  
 245 250 255  
 Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser Asn  
 260 265 270  
 Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr Gly  
 275 280 285  
 Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp Pro Thr  
 290 295 300

## 045598

Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu  
305 310 315 320

Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu Gln  
325 330 335

Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly  
340 345 350

Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro  
355 360 365

Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Glu  
370 375 380

Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe  
385 390 395 400

Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe  
405 410 415

Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Lys Pro Val  
420 425 430

Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly Gly Gln  
435 440 445

Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly Glu  
450 455 460

Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu Thr Ala  
465 470 475 480

Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu Asp Ile  
485 490 495

Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln Ala Trp  
500 505 510

Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly Phe  
515 520 525

Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile Asn  
530 535 540

Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser Leu  
545 550 555 560

Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr Gln  
565 570 575

Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile Val  
580 585 590

045598

Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr Pro Gly  
595 600 605

Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg Gly Gly  
610 615 620

Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp  
625 630 635 640

Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser  
645 650 655

Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr  
660 665 670

Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe  
675 680 685

<210> 55  
<211> 670  
<212> PRT  
<213> Крысиная

<400> 55

Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val  
1 5 10 15

Ser Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser Trp  
20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Phe Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His  
35 40 45

Phe Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu  
50 55 60

Thr Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr  
65 70 75 80

Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro  
85 90 95

Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe  
100 105 110

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg  
115 120 125

Thr Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr  
130 135 140

Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His Gln



045598

Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly  
 435 440 445

Glu Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu Thr  
 450 455 460

Ala Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu Asp  
 465 470 475 480

Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln Ala  
 485 490 495

Trp Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly  
 500 505 510

Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile  
 515 520 525

Asn Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser  
 530 535 540

Leu Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr  
 545 550 555 560

Gln Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile  
 565 570 575

Val Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr Pro  
 580 585 590

Gly Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg Gly  
 595 600 605

Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu  
 610 615 620

Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly  
 625 630 635 640

Ser Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val  
 645 650 655

Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe  
 660 665 670

- <210> 56
- <211> 28
- <212> ДНК
- <213> Искусственная последовательность
- <220>
- <223> Homo Sapiens
- <400> 56

atgaggctgc tgaccctcct ggccttc 28

<210> 57  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Homo Sapiens

<400> 57  
 gtgccctcc tgcgtcacct ctg 23

<210> 58  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Homo Sapiens

<400> 58  
 cacaggtgac gcagggggg cac 23

<210> 59  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Homo Sapiens

<400> 59  
 ttaaaatcac taattatggt ctcgatc 27

<210> 60  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Мышиная

<400> 60  
 atgaggctac tcatcttctt gg 22

<210> 61  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Мышиная

<400> 61  
 ctgcagaggt gacgcagggg ggg 23

<210> 62  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Мышиная



<400> 62 ccccccctgc gtcacctctg cag	23
<210> 63 <211> 29 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Мышиная	
<400> 63 ttagaaatta cttattatgt tctcaatcc	29
<210> 64 <211> 29 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Крысиная	
<400> 64 gagtgacgc aggaggggca ttagtgttt	29
<210> 65 <211> 37 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Крысиная	
<400> 65 стагааас таатгссст сctgcgtcac ctctgca	37
<210> 66 <211> 354 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Синтетическая	
<400> 66 caggtcacct tgaaggagtc tggtcctgtg ctggtgaaac ccacagagac cctcacgctg	60
acctgcaccg tctctgggtt ctcactcagc aggggtaaaa tgggtgtgag ctggatccgt	120
cagccccag ggaaggccct ggagtggctt gcacacattt tttcgagtga cgaaaaatcc	180
tacaggacat cgctgaagag caggctcacc atctccaagg acacctcaa aaaccagggtg	240
gtccttaca tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca cgtattactg tgcacggata	300
cgacgtggag gaattgacta ctggggccag ggaaccctgg tcactgtctc ctca	354
<210> 67 <211> 118 <212> PRT <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Синтетическая	

## 045598

&lt;400&gt; 67

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Gly  
20 25 30

Lys Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Tyr Arg Thr Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Arg Arg Gly Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетическая

&lt;400&gt; 68

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Thr  
20 25 30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala  
50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn  
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val  
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Phe Gly Val Pro Phe Asp Ile Trp Gly

## 045598

100

105

110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 69  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 69

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Tyr  
35 40 45

Gln Asp Lys Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 70  
<211> 324  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 70  
tcctatgagc tgatacagcc accctcgggtg tcagtggccc caggacagac ggccaccatt 60  
acctgtgcgg gagacaacct tgggaagaaa cgtgtgcact ggtaccagca gaggccaggc 120  
caggcccctg tgttggtcat ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat cctgaccga 180  
ttctctgcct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcaactagggg cgaagccggg 240  
gatgaggccg actattattg tcagggtgtgg gacattgcta ctgatcatgt ggtcttcggc 300  
ggagggacca agctcaccgt ccta 324

<210> 71  
<211> 120  
<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 71

Ser Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ala Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Arg Val  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Gly Glu Ala Gly  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ile Ala Thr Asp His  
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ala Ala Ala Gly  
100 105 110

Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu  
115 120

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения пациента млекопитающего, страдающего зависимой от ангиогенеза злокачественной опухолью, выбранной из группы, состоящей из колоректального рака, рака молочной железы, легких, почек, печени, пищевода, яичников, поджелудочной железы, предстательной железы, рака желудка, глиомы, стромальной опухоли желудочно-кишечного тракта, лимфомы, меланомы и карциноидной опухоли, или

зависимой от ангиогенеза доброкачественной опухолью, выбранной из группы, состоящей из гемангиомы, акустической невриномы, нейрофибромы, трахомы, карциноидных опухолей и пиогенных гранулем,

включающий введение пациенту композиции, содержащей моноклональное антитело или его фрагмент, ингибирующее MASP-2, которое специфически связывается с частью SEQ ID NO: 6,

где моноклональное антитело или его фрагмент, ингибирующее MASP-2, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 67, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 69.

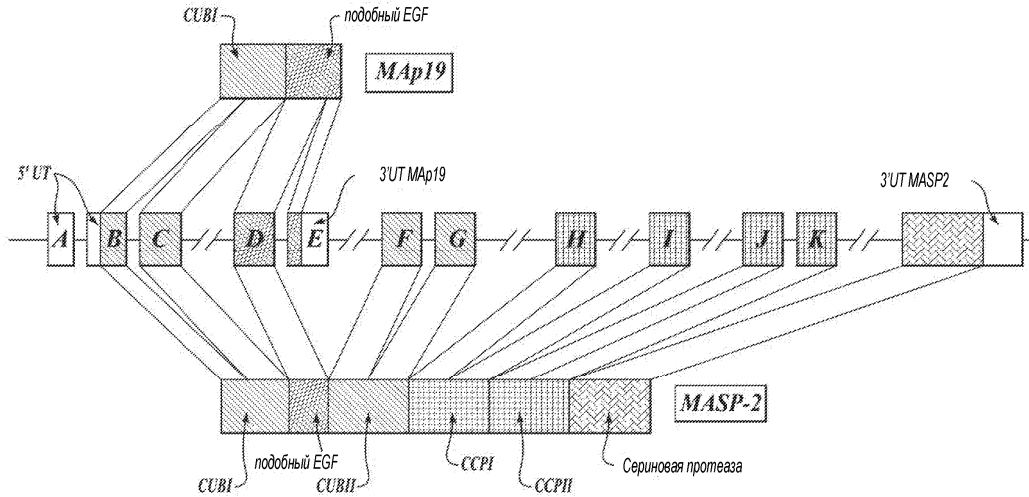
2. Способ по п.1, где у пациента имеется зависимая от ангиогенеза злокачественная опухоль, выбранная из группы, состоящей из: солидной(ых) опухоли(ей), распространяющихся через кровь опухолей, карциноидных опухолей высокого риска и метастазов опухолей.

3. Способ по п.2, где у пациента имеется одна или несколько солидных опухолей, и способ включает введение ингибитора MASP-2 в количестве, эффективном для ингибирования ангиогенеза опухолей.

4. Способ по п.3, где пациент страдает или подвержен риску метастазирования опухолей, и способ включает введение ингибитора MASP-2 в количестве, эффективном для ингибирования метастазирования опухолей.

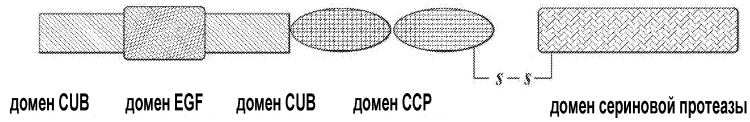
5. Способ по п.1, где антитело или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из рекомбинантного антитела, антитела со сниженной эффекторной функцией, химерного антитела, гуманизированного антитела и антитела человека.

6. Способ по п.1, где композицию вводят подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутриа-териально или внутривенно.

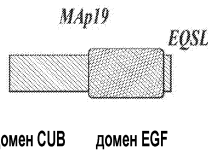


Фиг. 1

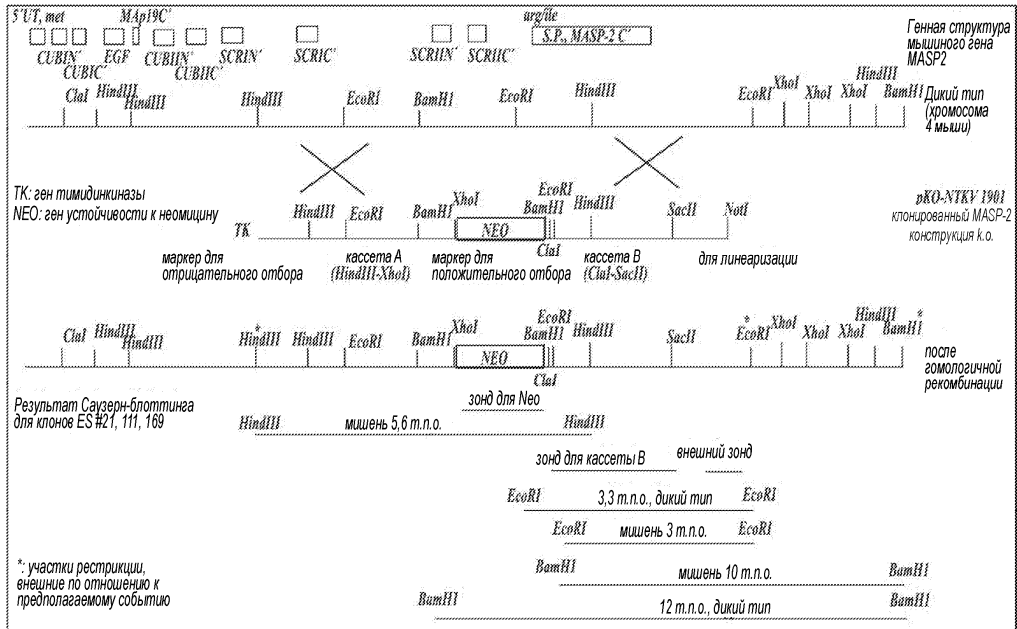
*Clr/Clс/MASP-1/MASP-2/MASP-3*



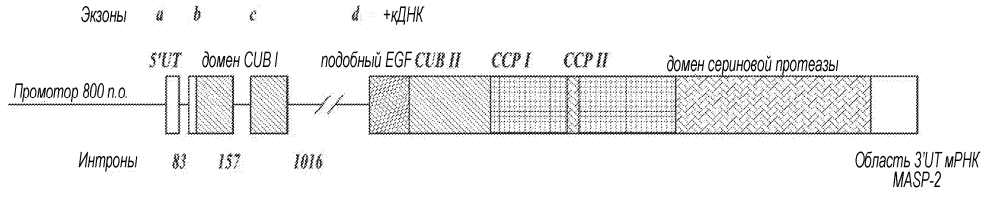
Фиг. 2А



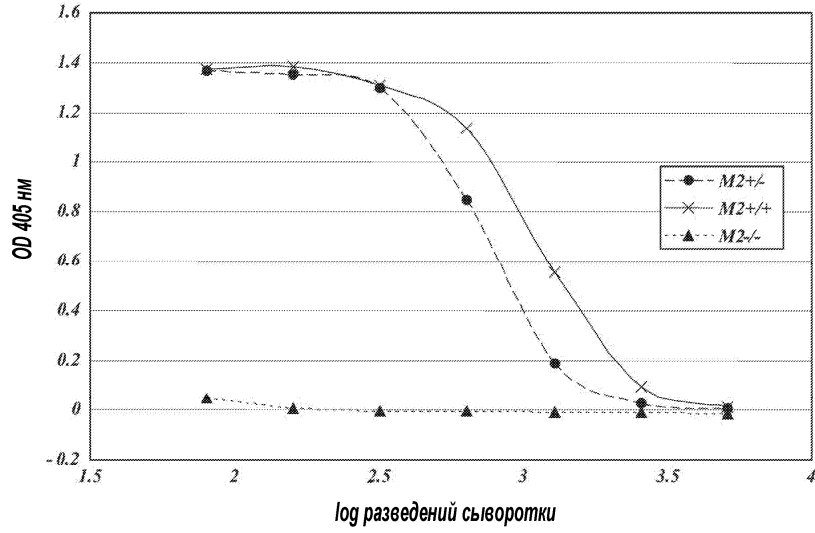
Фиг. 2В



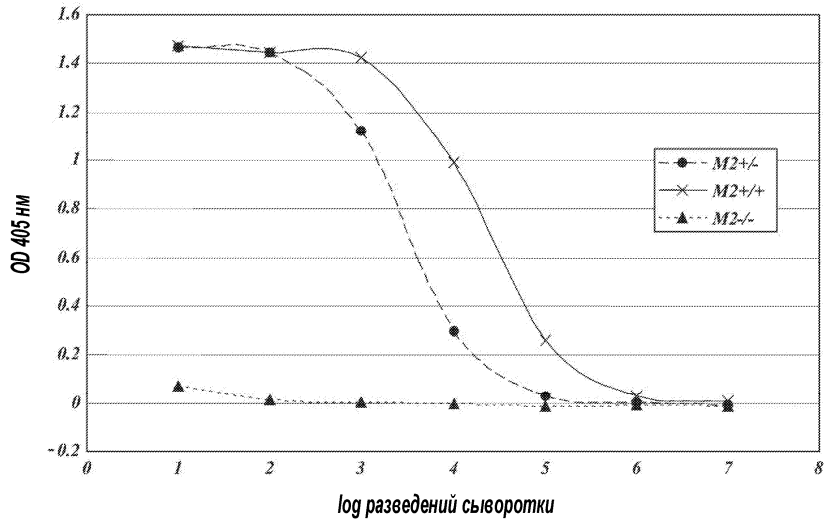
Фиг. 3



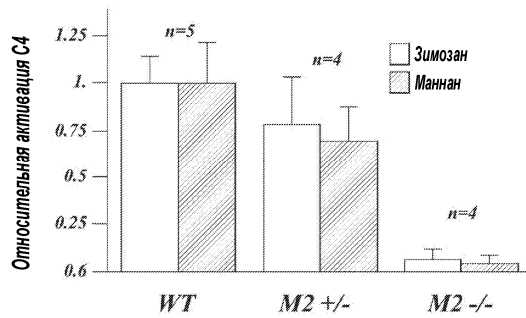
Фиг. 4



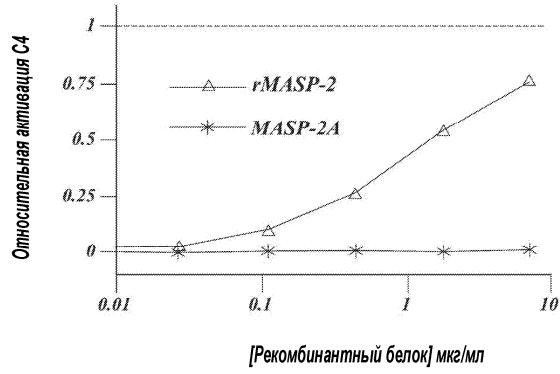
Фиг. 5A



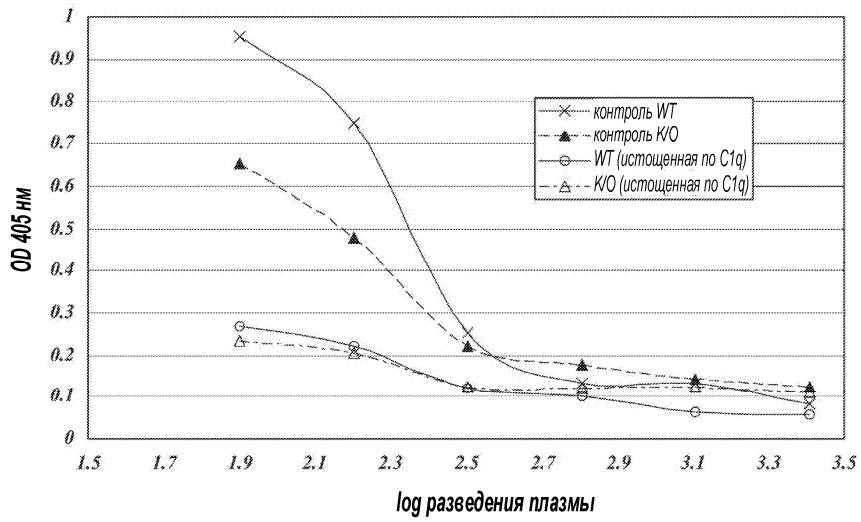
Фиг. 5B



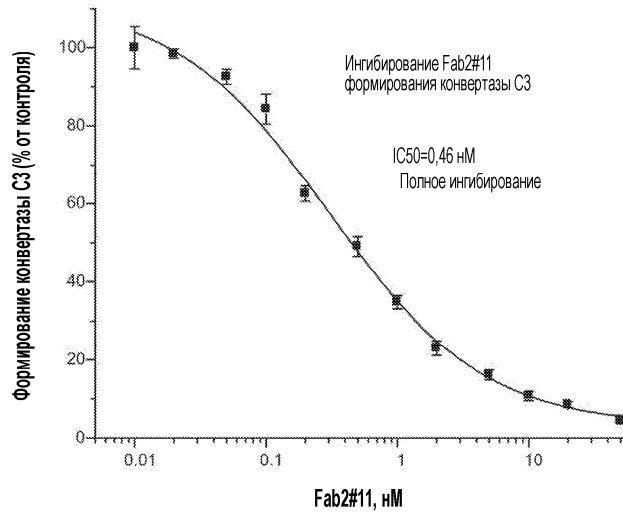
Фиг. 5C



Фиг. 6

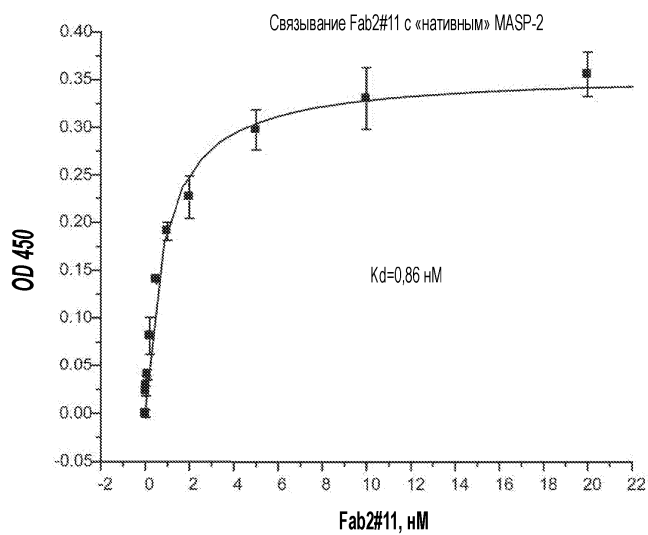


Фиг. 7

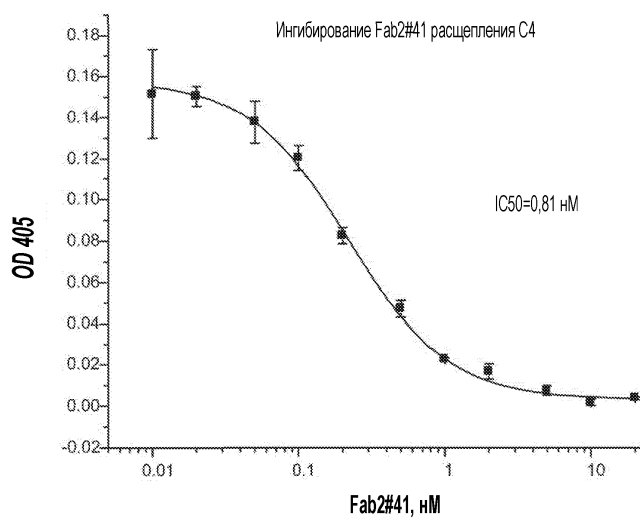


Фиг. 8А

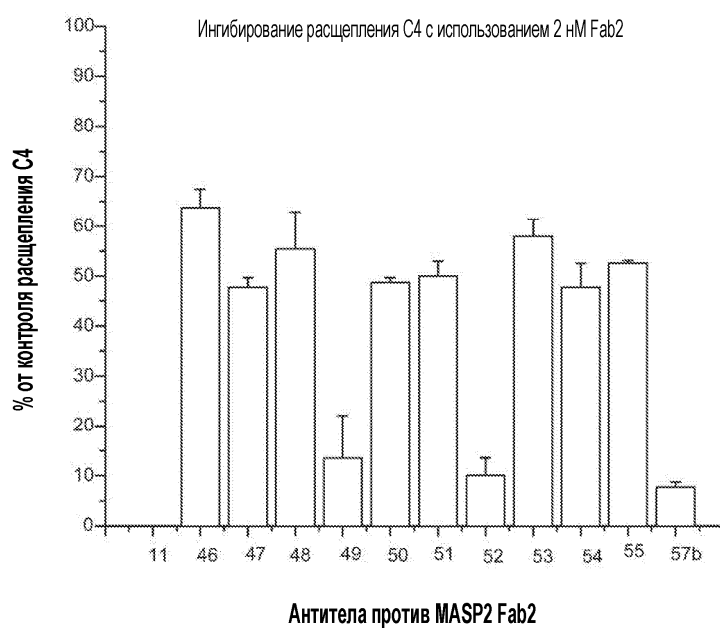
045598



Фиг. 8В

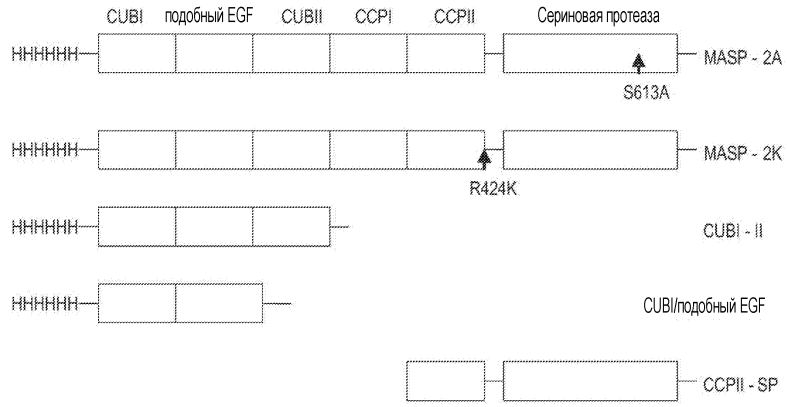


Фиг. 8С



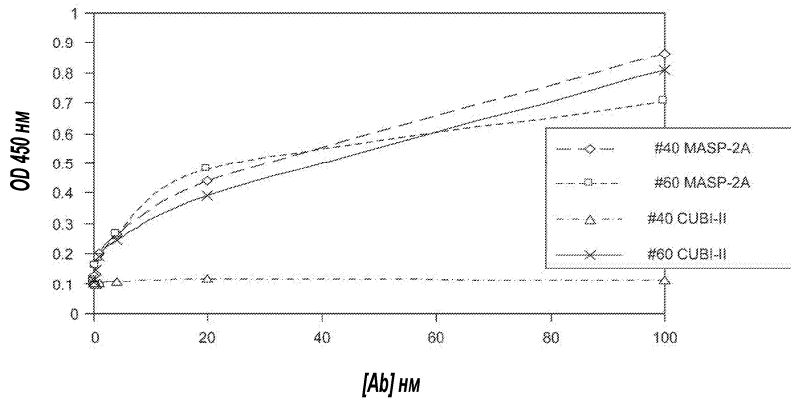
Фиг. 9



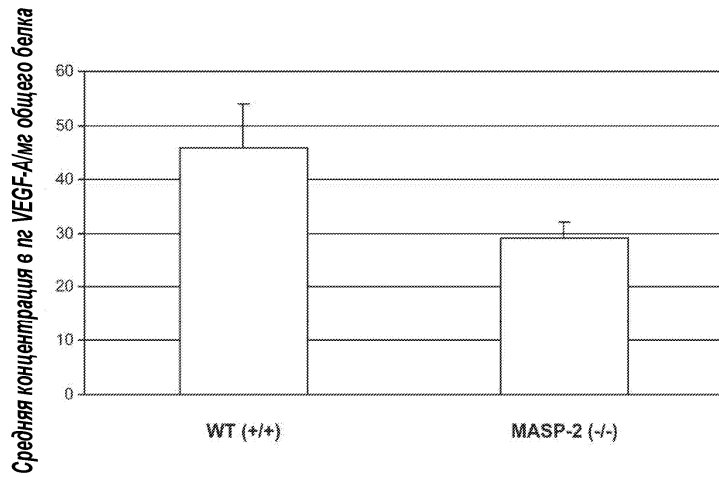


Фиг. 10

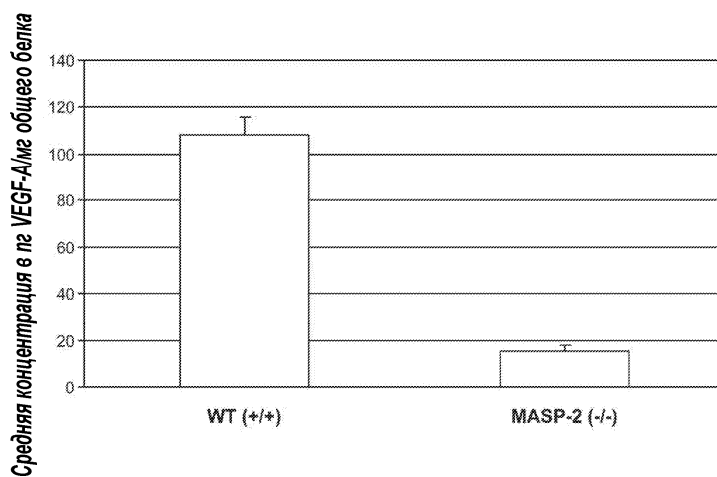
Связывание AbD Ab #40 и #60 с полипептидами крысиного MASP2



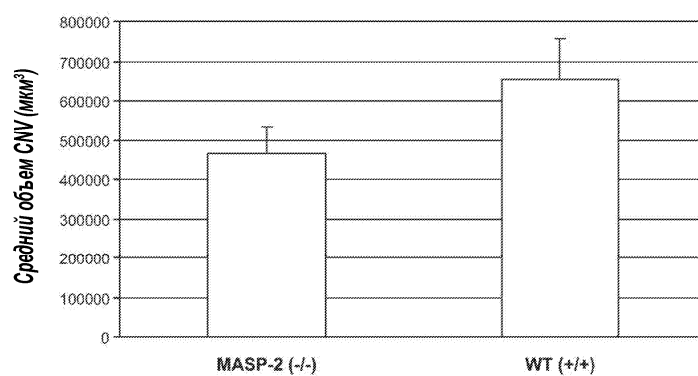
Фиг. 11



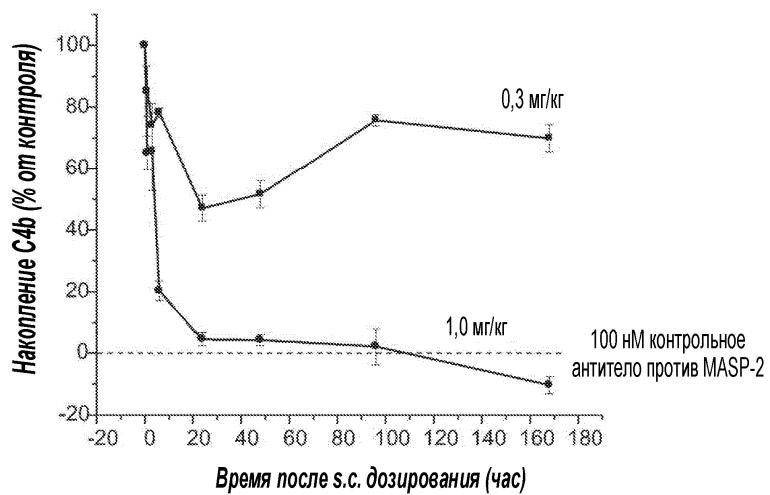
Фиг. 12А



Фиг. 12В

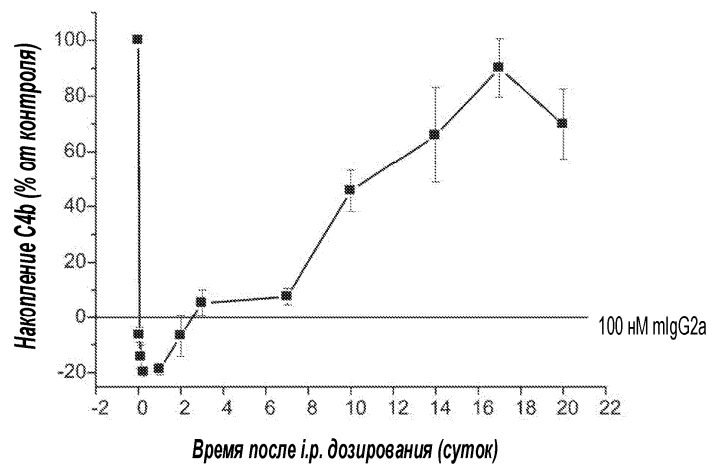


Фиг. 13

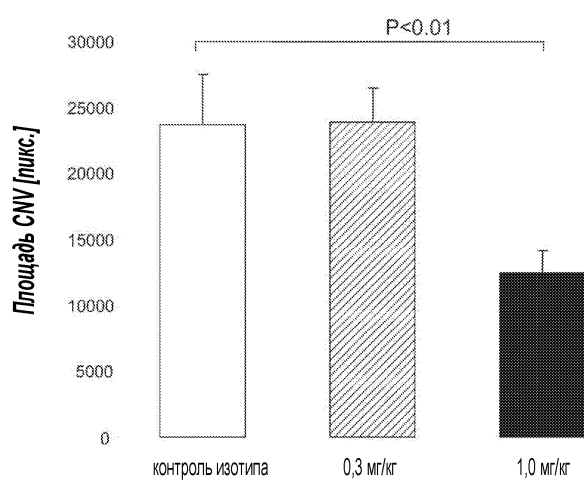


Фиг. 14

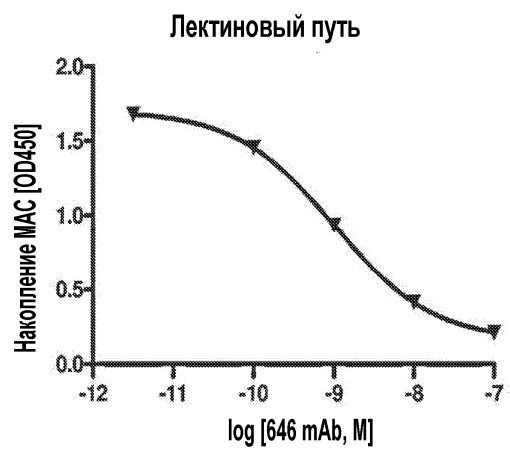
045598



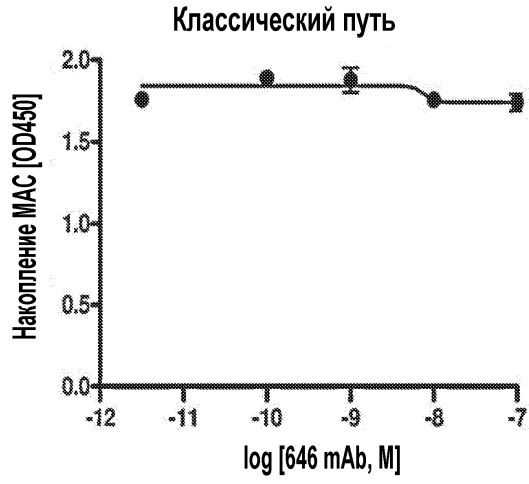
Фиг. 15



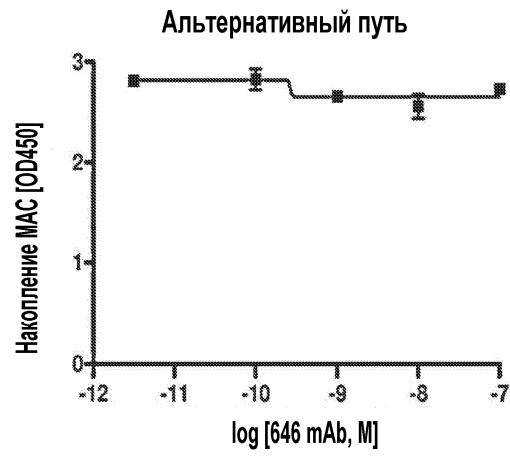
Фиг. 16



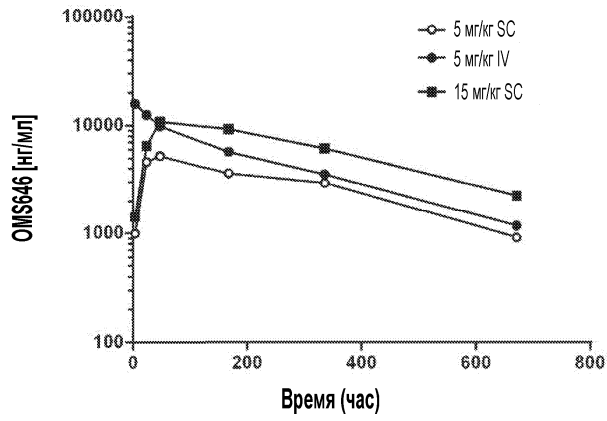
Фиг. 17А



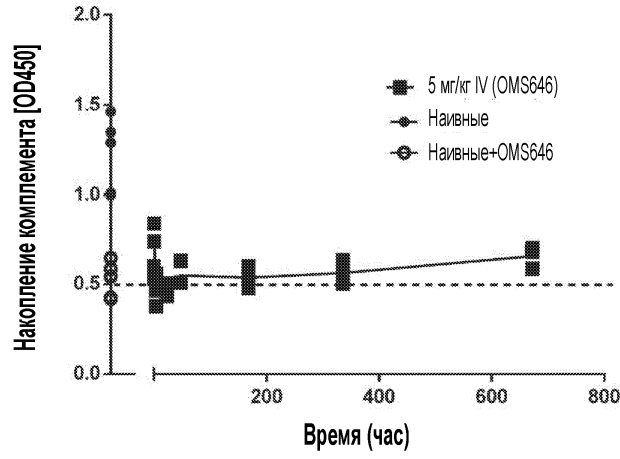
Фиг. 17В



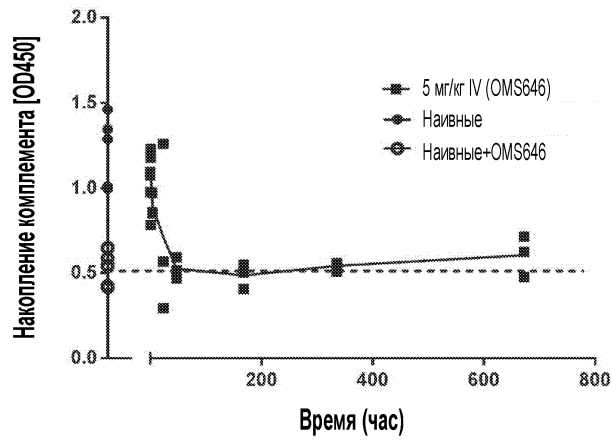
Фиг. 17С



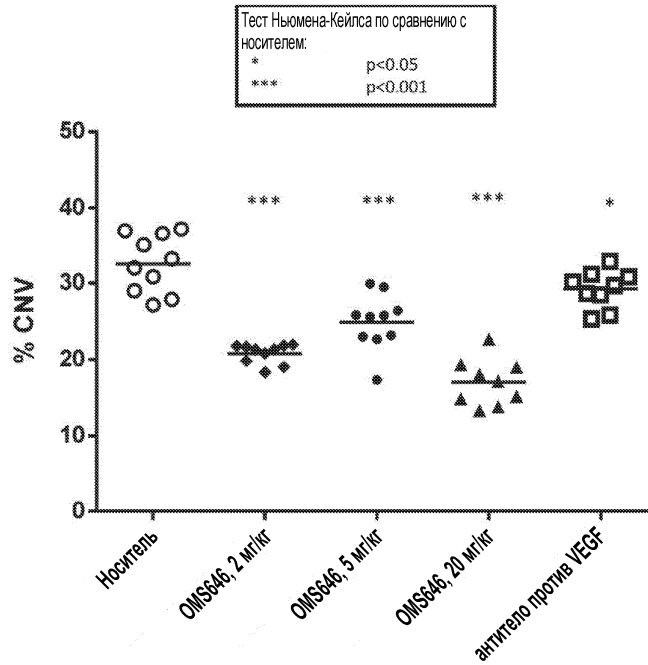
Фиг. 18



Фиг. 19А



Фиг. 19В



Фиг. 20

