



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95304 (13) C2

(51) МПК

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ АНТАГОНІСТА DLL4 ДЛЯ ЗАПОБІГАННЯ АБО ЗНИЖЕННЯ ВТРАТИ КРОВОНОСНИХ СУДИН

1

(21) а200902033
(22) 07.08.2007
(24) 25.07.2011
(86) PCT/US2007/017546, 07.08.2007
(31) 60/836,003
(32) 07.08.2006
(33) US
(46) 25.07.2011, Бюл.№ 14, 2011 р.
(72) УІГАНД СТЕНЛІ ДЖ., US, ПАПАДОПУЛОС
НІКОЛАС ДЖ., US, ЛОБОВ ІВАН Б., US
(73) РІДЖЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ІНК., US
(56) US 2006/0134121 A1 22.06.2006
WO 2007/143689 A & UA 200900119 06.06.2006
(57) 1. Застосування антагоніста дельтаподібного
ліганду 4 (Dll4) при виробництві ліків для запоби-
гання або зниження втрати кровоносних судин
і/або промотування продуктивного ангіогенезу у
пацієнта, який має ішемічне ушкодження або су-
динну недостатність, де антагоніст Dll4 включає
антитіло або фрагмент антитіла, яке специфічно
зв'язує Dll4 і блокує зв'язування Dll4 з рецептором
Notch, або включає позаклітинний домен Dll4, не-
обов'язково з'єднаний з мультимеризованим ком-
понентом.
2. Застосування за п. 1, де антитіло до Dll4 або
фрагмент антитіла є поліклональним або монок-
лональним.
3. Застосування за п. 2, де антитіло або фрагмент
антитіла є гуманізованим, химерним або є антиті-
лом або фрагментом антитіла, що повністю сто-
суються людини.
4. Застосування за п. 3, де фрагмент антитіла яв-
ляє собою одноланцюгове антитіло, Fab або
F(ab')₂.
5. Застосування за п. 1, де мультимеризований
компонент являє собою домен Fc IgG.
6. Застосування за будь-яким з пп. 1-5, де суб'єк-
том, що піддається лікуванню, є людина і де іше-
мічне ушкодження або судинна недостатність виб-
рана з ретинопатії передчасного розвитку,
ішемічної ретинопатії, ретинальної венозної або
артеріальної непрохідності і діабетичної ретинопатії.
7. Застосування за будь-яким з пп. 1-5, де суб'єк-
том, що піддається лікуванню, є людина і де іше-

2

мічне ушкодження або судинна недостатність виб-
рана з церебральної ішемії, ішемії серця, ішеміч-
них станів, що впливають на кінцівки, артеріовено-
зної мальформації, загосення дрібних ран, плацен-
тарної недостатності, звуження і непрохід-
ності артерій, атеросклерозу і системної або
мональної гіпертензії.

8. Застосування антагоніста дельтаподібного ліга-
нду 4 (Dll4) для запобігання або зниження втрати
кровоносних судин і/або промотування продуктив-
ного ангіогенезу, у пацієнта, що має ішемічне
ушкодження або судинну недостатність, де анта-
гоніст Dll4 включає антитіло або фрагмент антиті-
ла, яке специфічно зв'язує Dll4 і блокує зв'язуван-
ня Dll4 з рецептором Notch, або включає
позаклітинний домен Dll4, необов'язково з'єднаний
з мультимеризованим компонентом.

9. Застосування за п. 8, де антитіло до Dll4 або
фрагмент антитіла є поліклональним або монок-
лональним.

10. Застосування за п. 9, де антитіло або фраг-
мент антитіла є гуманізованим, химерним або є
антитілом або фрагментом антитіла, що повністю
стосуються людини.

11. Застосування за п. 10, де фрагмент антитіла
являє собою одноланцюгове антитіло, Fab або
F(ab')₂.

12. Застосування за п. 8, де мультимеризований
компонент являє собою домен Fc IgG.

13. Застосування за будь-яким з пп. 8-12, де су-
б'єктом, що піддається лікуванню, є людина і де
ішемічне ушкодження або судинна недостатність
вибрана з ретинопатії передчасного розвитку,
ішемічної ретинопатії, ретинальної венозної або
артеріальної непрохідності і діабетичної ретинопатії.

14. Застосування за будь-яким з пп. 8-12, де су-
б'єктом, що піддається лікуванню, є людина і де
ішемічне ушкодження або судинна недостатність
вибрана з церебральної ішемії, ішемії серця, іше-
мічних станів, що впливають на кінцівки, артеріо-
венозної мальформації, загосення дрібних ран,
плацентарної недостатності, звуження і непрохід-
ності артерій, атеросклерозу і системної або пуль-
мональної гіпертензії.

(13) C2

(11) 95304

(19) UA

Даний винахід стосується, в основному, способів лікування васкулярних та ішемічних захворювань шляхом введення композицій, які інгібують взаємодію Dll4 з рецепторами Notch і/або активацію рецепторів Notch. Більш конкретно, даний винахід стосується способів лікування васкулярних і/або ішемічних захворювань очей шляхом введення композицій, які інгібують взаємодію Dll4 з рецепторами Notch.

Ангіогенез є фундаментальним процесом, необхідним для нормального розвитку і росту тканин і органів, і включає утворення нових кровоносних судин з попередніх судин. Ангіогенез і гомеостаз кровоносних судин тісно контролюється за допомогою сильно регульованої системи ангіогенних модулаторів. Відхилення від такого тісного контролю часто приводить до або пов'язане із захворюванням.

Хоча нерегульований «надмірний» або аберантний ангіогенез є характеристикою численних хворобливих станів, недостатній ангіогенез, втрата кровоносних судин або функціональна, або структурна непрохідність кровоносних судин також може бути серйозною медичною проблемою. Активация ангіогенезу і/або попередження регресії існуючих кровоносних судин доцільні у ситуаціях, де тканина стає ішемічною, наприклад, при ретинальній, церебральній, серцево-судинній ішемії та ішемії кінцівок і в умовах, де повинне бути встановлене, повторно встановлене, посилене або розширене васкулярне забезпечення, наприклад, при загосні дрібних ран і після трансплантації тканин або органів, або для стимуляції утворення колатеральних судин або іншого способу збільшення перфузії тканини або органу з порушеною циркуляцією.

Шлях передачі сигналів Notch являє собою систему міжклітинного зв'язку, яка використовується великим числом еукаріотів у багатьох біологічних процесах, таких як диференціювання, проліферація і гомеостаз (Artavanis-Tsakonas et al. (1999) *Science* 284:770-776). Шлях передачі сигналів Notch також залучений до контролю розвитку судин (Iso et al. (2003) *Arterioscler Thromb Vase Biol.* 23:543-553).

Дельтаподібний 4 (Dll4) або дельтаподібний ліганд 4 (DlU) (тут і далі «Dll4») є членом сімейства Дельта лігандів Notch, який проявляє у високій мірі селективну експресію м'язовим ендотелієм (Shutter et al. (2000) *Genes Dev.* 14:1313-1318). Dll4 є лігандом для рецепторів Notch, включаючи Notch 1 і Notch 4. Послідовності нуклеїнових кислот і амінокислот для Dll4 миші і людини представлені у SEQ ID NO:1-2 і SEQ ID NO:3-4, відповідно. Були одержані миші з ген-міченим Dll4 (див., наприклад, Duarte et al. (2004) *Genes Dev.* 18:2474-2478; Krebs et al. (2004) *Genes Dev.* 18:2469-2473; Gale et al. (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15949-15954). Ці дослідження показали, що Dll4 сильно експресувався на кровоносних судинах, що розвиваються, ембріона миші, і що генетична делеція навіть однієї алелі Dll4 приводила до ембріональної летальності, пов'язаної з характерними васкулярними

порушеннями.

Даний винахід стосується способів лікування захворювань, що впливають на серцево-судинну систему за допомогою речовин, здатних блокувати взаємодію Dll4 з його рецепторами (антагоністи Dll4). Надані у даному описі експериментальні результати підтверджують використання антагоністів Dll4 для лікування захворювань, що характеризуються патологічною реваскуляризацією і м'язовою недостатністю, де васкулярна недостатність обумовлена втратою кровоносних судин або функціональними васкулярними змінами, що приводять до недостатнього кровопостачання тканин. Антагоністи Dll4, зокрема, використовуються для лікування васкулярних захворювань очей, наприклад, діабетичної ретинопатії, ретинопатії передчасного розвитку та інших офтальмологічних захворювань, що характеризуються патологічним ангіогенезом і/або ретинальною ішемією, такою ж ретинальна венозна або артеріальна непрохідність.

Показано, що патологічне інгібування Dll4 надає декілька корисних ефектів у моделі ішемічної ретинопатії, включаючи зменшення втрати кровоносних судин, коли застосовується під час ушкодження, що приводить до втрати кровоносних судин, і придушення розвитку патологічних змін у судинній сітці, коли посилюється повторний ріст більш нормальних, функціональних кровоносних судин, коли застосовується після встановлення ішемії.

Очікується, що патологічні речовини, які інгібують сигнальну систему Dll4, будуть подібним чином корисні для лікування інших форм ішемічного ушкодження, включаючи церебральну ішемію, ішемію серця та ішемічні стани, що впливають на кінцівки та інші органи або тканини тіла. Очікується також, що інгібітори Dll4 будуть клінічно корисними при інших станах, які потребують встановлення або повторного встановлення васкулярного забезпечення, або будуть іншим чином корисні від посилення перфузії тканини. Прикладами таких станів є артеріовенозні мальформації, загосні дрібних ран, трансплантація органу або тканини і плацентарна недостатність. Як показано в експериментальній роботі, наданій нижче, інгібування Dll4 запобігає звуженню і непрохідності артерій, свідчаючи, що інгібітори Dll4 повинні бути ефективними при лікуванні системної або легеневої гіпертензії і споріднених захворювань.

У наш час показано, що антагоністи Dll4 ефективні для стимуляції продуктивного ангіогенезу як у нормі, так і при патологічних станах. Зокрема, показано, що блокування сигнального шляху Dll4-Notch посилює ангіогенне проростання і проліферацію ендотеліальних клітин судин у ретинальній судинній сітці, що розвивається, і придушує утворення патологічної, ектопічної реваскуляризації і розвиток артеріовенозного анастомозу на користь більш адекватного судиноутворення в ішемічній ретині. Крім того, показано, що застосування блокаторів Dll4 при судинному ушкодженні помітно зменшує подальшу втрату кровоносних судин. Ці

виявлення підтверджують застосування антагоніста Dll4 для лікування очних захворювань, які характеризуються васкулярними порушеннями, що особливо супроводжуються ішемією і втратою нормальних судин. Приклади таких очних захворювань включають ішемічні ретинопатії, такі як вікова макулярна дегенерація, непрохідність центральної ретинальної вени або непрохідність відгалужень ретинальної вени, діабетичну ретинопатію і ретинопатію передчасного розвитку.

У першому аспекті винахід описує спосіб лікування порушення або захворювання очей, що характеризується васкулярними порушеннями, що включає введення антагоніста Dll4 суб'єкту, який потребує цього. Спосіб винаходу прискорює ріст функціональних нормальних судин, інгібує ріст аномальних або неправильних судин і перешкоджає патологічній регресії кровоносних судин.

В одному варіанті здійснення антагоніст Dll4 являє собою антитіло або фрагмент антитіла, що специфічно зв'язується з Dll4 і блокує зв'язування Dll4 з рецептором Notch (наприклад, рецепторами Notch 1 і Notch 4). В іншому варіанті здійснення антагоніст Dll4 за винаходом являє собою білок або фрагмент білка, що включає позаклітинний домен Dll4 або його фрагмент, який у конкретних варіантах здійснення може бути злитий з мультимеризованим компонентом і який зв'язується з рецепторами Notch, не активуючи їх, чим блокують дію ендогенного Dll4.

Розлад або захворювання очей, що піддається лікуванню за допомогою способу за винаходом, являє собою розлад офтальмологічної судинної системи, що характеризується наявністю аномальних судин і/або втратою нормальних судин або функції нормальних судин. У конкретних варіантах здійснення, стан або розлад, що піддається лікуванню, включає ретинопатію передчасного розвитку, ішемічну ретинопатію, ретинальну венозну або артеріальну непрохідність, діабетичну ретинопатію, хороїдальну реваскуляризацію, вікову дегенерацію жовтої плями, корнеальну реваскуляризацію, реваскулярну глаукому або корнеальну трансплантацію.

Антитіло або фрагмент антитіла, що застосовується у способі за винаходом, може бути поліклональним або моноклональним, і може бути таким, що частково належить людині, химерним або таким, що повністю належить людині. Переважно, антитіло являє собою повністю моноклональне антитіло людини або фрагмент моноклонального антитіла. Фрагмент антитіла може бути одноланцюжковим алггитілом, ScFv, Fab або F(ab')₂.

У випадку, коли антагоніст Dll4 являє собою білок або білковий фрагмент, фрагмент переважно є позаклітинним доменом Dll4 або його фрагментом, або модифікованим фрагментом, і може бути злитий з мультимеризованим компонентом. Мультимеризований компонент є переважно доменом імуноглобуліну, таким як, наприклад, домен Fc, наприклад, Fc людини (SEQ ID NO:5). Білок може необов'язково містити сигнальну послідовність, яка може бути нативною для клітини, рекомбінантною або синтетичною.

У розширеному аспекті, спосіб за винаходом

застосовний для лікування будь-якого ішемічного захворювання або стану, викликаного недостатнім кровопостачанням, обумовленим втратою кровоносних судин і/або слабкою перфузією, наприклад, ішемічним ушкодженням, церебральною ішемією, ішемією серця, ішемічними станами, що впливають на кінцівки та інші органи або тканини, артеріовенозними мальформаціями, загоєнням дрібних ран, трансплантацією органу або тканини, плацентарною недостатністю, артеріальним звуженням і непрохідністю, атеросклерозом і системною або пульмонарною гіпертензією.

У другому аспекті винахід стосується застосування речовини, здатної інгібувати активність Dll4, при виготовленні ліків для лікування, придушення або полегшення ішемічного або васкулярного розладу, де антагоністом Dll4 є антитіло або фрагмент антитіла, здатного блокувати зв'язування Dll4 з рецептором Notch, або фрагмент Dll4, необов'язково з'єднаний з мультимеризованим компонентом (таким як домен Fc). В одному варіанті здійснення ішемічний або васкулярний розлад являє собою захворювання або стан очей, що характеризується наявністю аномальних кровоносних судин і/або втратою нормальних кровоносних судин або судинної функції. Очне захворювання являє собою ретинопатію передчасного розвитку, ішемічну ретинопатію, ретинальну венозну або артеріальну непрохідність, діабетичну ретинопатію, хороїдальну реваскуляризацію, вікову дегенерацію жовтої плями, корнеальну реваскуляризацію, неоваскулярну глаукому або корнеальну трансплантацію.

В іншому варіанті здійснення ішемічний або васкулярний розлад являє собою ішемічне ушкодження, церебральну ішемію, ішемію серця, ішемічні стани, що впливають на кінцівки та інші органи або тканини, артеріовенозні мальформації, загоєння дрібних ран, трансплантацію органів або тканини, плацентарну недостатність, звуження і непрохідність артерій, атеросклероз, і системну або пульмональну гіпертензію.

Інші предмети і переваги стануть очевидними з огляду наведеного далі докладного опису.

Короткий опис фігур:

Фіг.1. Генетична делеція однієї алелі Dll4 збільшувала число ангіогенних проростань у розвитку ретинальної судинної системи. Число проростань кількісно визначали у полі мікроскопу при 100х збільшенні. Результати значно відрізнялися при рівні $p < 0,00001$.

Фіг.2. Внутрішньоочне введення Dll4-Fc збільшувало число проліферуючих BrdU-позитивних клітин у розвитку ретинальної судинної системи. 4,15 мкг mDll4-hFc або 5 мкг контрольного білка hFc людини вводили у склоподібне тіло 7-денних дитинчат миші. Ретинальну судинну систему аналізували через 24 години. Число BrdU-позитивних клітин кількісно визначали у полі мікроскопу при 200х збільшенні. Результати значно відрізнялися при рівні $p < 0,05$.

Фіг.3A-B. Внутрішньоочне введення Dll4-Fc або антитіла анти-Dll4 стимулює поновлення росту ретинальних судин у миші з індукованою киснем ішемічною ретинопатією (OIR). (A) 0,48 мкг mDll4-

hFc або 0,5 мкг контрольного білка hFc людини вводили у склоподібне тіло 13-денних (постнатальний день 13, або P13) OIR дитинчат миші. Ретинальну судинну систему аналізували на P17. (B) 2,55 мкг поліклонального антитіла кролика анти-mDII4 або 5 мкг контрольного білка hFc людини вводили у склоподібне тіло на P13. Ретинальну судинну систему аналізували на P17. У ретинальних мікропрепаратах визначали аваскулярні області. Результати значно відрізнялися при рівнях $p < 0,0001$ (A) і $p < 0,05$ (B).

Фіг.4A-B. Внутрішньоочне введення DII4-Fc або антитіла анти-DII4 підвищує утворення патологічної ревазуляризації в OIR. (A) 0,48 мкг mDII4-hFc або 0,5 мкг контрольного білка hFc людини вводили у склоподібне тіло на P13. Ретинальну судинну систему аналізували на P17. (B) 2,55 мкг поліклонального антитіла кролика анти-mDII4 або 5 мкг контрольного білка hFc людини вводили у склоподібне тіло на P13. Ретинальну судинну систему аналізували на P17. Аномальні васкулярні області (області, що містять ектопічні васкулярні «пучки») визначали у ретинальних мікропрепаратах. Результати значно відрізнялися при рівнях $p < 0,0001$ (A) і $p < 0,05$ (B).

Фіг.5. Внутрішньоочне введення DII4-Fc поліпшує ретинальну перфузію. 0,48 мкг mDII4-hFc або 0,5 мкг контрольного білка hFc людини вводили у склоподібне тіло на P13. На P17 тварин піддавали перфузії лектином томатів, міченим Texas Red, і ретинальну судинну систему аналізували на P17. Неперфузні васкулярні області вимірювали у ретинальних мікропрепаратах. Результати значно відрізнялися при рівні $p < 0,0005$.

Фіг.6A-B. Внутрішньоочне введення DII4-Fc або антитіла анти-DII4 зменшує ретинальну гіпоксію/ішемію. (A) 4,1 мкг mDII4-hFc або 0,5 мкг контрольного білка hFc людини вводили у склоподібне тіло на P12. Нурохургобе™-1 вводили у склоподібне тіло за одну годину до забою тварин. Ретинальну судинну систему аналізували на P17. Нурохургобе-мічені області визначали у ретинальних мікропрепаратах. (B) 2,55 мкг поліклонального антитіла кролика анта-mDII4 або 5 мкг контрольного білка hFc людини вводили у склоподібне тіло на P13. Нурохургобе™-1 вводили у склоподібне тіло за одну годину до забою тварин. Ретинальну судинну систему аналізували на P17. Нурохургобе-мічені області визначали у ретинальних мікропрепаратах. Результати значно відрізнялися при рівнях $p < 0,001$ (A) і $p < 0,05$ (B).

Фіг.7. Генетична делеція однієї алелі DII4 зменшує втрату кровоносних судин, індуковану впливом гіпероксії. DII4^{+/-lacZ} і однопиплідних контрольних мишей дикого типу вміщували в атмосферу 75% кисню на P7. Ретинальну судинну систему аналізували у мікропрепаратах на P12. Результати значно відрізнялися при рівні $p < 0,05$.

Фіг.8A-B. Внутрішньоочне введення DII4-Fc або антитіла анти-DII4 зменшує або перешкоджає втраті кровоносних судин, індукованій впливом гіпероксії. (A) 4,1 мкг mDII4-hFc або 0,5 мкг контрольного білка hFc людини вводили у склоподібне тіло на P8. Дитинчат вміщували в атмосферу 75% кисню на P9. Ретинальну судинну систему аналізували на P10. (B) 2,55 мкг поліклонального анти-

тіла кролика анти-mDII4 або 5 мкг контрольного білка hFc людини вводили у склоподібне тіло на P8. Дитинчат вміщували в атмосферу 75% кисню на P9. Ретинальну судинну систему аналізували на P10. Результати значно відрізнялися при рівнях $p < 0,00001$ (A) і $p < 0,0001$ (B).

Фіг.9A-B. Внутрішньоочне введення DII4-Fc або антитіла анти-DII4 зменшує ретинальну судинну непротісність. (A) 4,1 мкг mDII4-hFc або 0,5 мкг контрольного білка hFc людини вводили у склоподібне тіло на P8. Дитинчат вміщували в атмосферу 75% кисню на P9. Дитинчат піддавали перфузії з флуоресцентним лектином і ретинальну судинну систему аналізували на P10. (B) 2,55 мкг поліклонального антитіла кролика анти-mDII4 або 5 мкг контрольного білка hFc людини вводили у склоподібне тіло на P8. Дитинчат вміщували в атмосферу 75% кисню на P9. Дитинчат піддавали перфузії з флуоресцентним лектином і ретинальну судинну систему аналізували на P10. Результати значно відрізнялися при рівнях $p < 0,00001$ (A) і $p < 0,0001$ (B).

Фіг.10. Внутрішньоочне введення DII4-Fc зменшує або перешкоджає втраті ретинальних кровоносних судин. 4,1 мкг mDII4-hFc або 0,5 мкг контрольного білка hFc людини вводили у склоподібне тіло (ITV) або hDII4-hFc вводили у склоподібне тіло з дозою 25 мг на кг маси тіла на P7. Дитинчат вміщували в атмосферу 75% кисню на P8. Ретинальну судинну систему аналізували на P9. Результати значно відрізнялися при рівнях $p < 0,0001$.

До опису способів за даним винаходом необхідно усвідомити, що даний винахід не обмежується конкретними способами і описаними експериментальними станами, оскільки такі способи і стани можуть змінюватися. Також потрібно усвідомити, що термінологія, використовувана у даному описі, служить лише для опису конкретних варіантів здійснення, і не призначена для обмеження, оскільки обсяг даного винаходу обмежується тільки доданою формулою винаходу.

Якщо не визначено особливо, всі технічні і наукові терміни, використовувані у даному описі, мають ті ж значення, які загальноприйняті фахівцями у галузі, якої стосується даний винахід. Хоча будь-які способи і матеріали, подібні або еквівалентні таким, описаним у даному описі, можуть бути використані у застосуванні або перевірці даного винаходу, зараз описуються переважні способи і матеріали.

Під виразом «антагоніст DII4» мають на увазі речовину, здатну інгібувати біологічну активність DU4 шляхом блокування взаємодії DII4 з його рецепторами. Інгібування активності DII4 може відбуватися завдяки інгібуванню активації рецептора або антитілом до DII4, або аналогом, або фрагментом DII4, який зв'язується, але не активує рецептор (непродуктивне зв'язування). Поширені інгібітори включають, як необмежувальні приклади, антитіла, здатні до розпаду або ослаблення внутрішніх зв'язків рецептори, олігонуклеотидні аптамери, пептиди або інші невеликі молекули-антагоністи і їх похідні, і модифіковані ліганди DII4, які зв'язуються зі своїм рецептором Notch, однак

не здатні активувати передачу сигналу через таке зв'язування. Інші підходи включають вплив на експресію гена, що кодує Dll4, або блокування активації рецептора Notch, наприклад, за допомогою siRNA або інгібіторів γ -секретази, відповідно.

«Нейтралізуюче» або «блокуюче» антитіло стосується антитіла, зв'язування якого з Dll4 приводить до інгібування біологічної активності Dll4. Це інгібування біологічної активності Dll4 можна оцінювати шляхом визначення одного або декількох індикаторів біологічної активності Dll4. Ці індикатори біологічної активності Dll4 можна оцінити за допомогою одного або декількох окремих стандартних тестів *in vitro* або *in vivo*, відомих у галузі (див. приклади нижче). Переважно, здатність антитіла нейтралізувати активність Dll4 оцінюють шляхом інгібування зв'язування Dll4 з рецептором Notch, таким як Notch 1 і Notch 4.

Шлях передачі сигналу Notch є еволюційно консервативним і грає ключові ролі при визначенні долі клітини і диференціюванні у багатьох тканинах під час ембріонального і постнатального розвитку. Основні компоненти шляху Notch експресуються у судинній системі і генетична делеція визначених компонентів Notch, включаючи Notch 1, Notch 1/Notch 4, Jagged1, Dll1, Dll4, Hey1/Hey2 або преценіліни, приводить до ембріональної летальності, пов'язаної з дефектами м'язової корекції. Хоча більшість цих генів експресується у багатьох тканинах і типах клітин, Dll4 значною мірою обмежений судинним ендотелієм; це дозволяє припустити, що Dll4 є ключовим лігандом для рецепторів Notch судинної системи.

Під час раннього ембріонального розвитку генетична делеція навіть однієї алелі Dll4 викликає сильні васкулярні порушення, які приводять до ембріональної летальності у більшості ліній мишей. Дійсно, серед множини генів, залучених до утворення і розвитку судин і ангиогенезу, гапліодна недостатність, як повідомлялося, приводить до основних васкулярних дефектів і ембріональної летальності тільки для Dll4 і VEGF-A. Рання ембріональна летальність перешкоджає більшості експериментальних маніпуляцій, роблячи їх складними для точного розуміння ролі Dll4 у васкулярному розвитку і при патологічних оточеннях.

Для подолання цього обмеження ефекти делеції гена Dll4 вивчали на лінії ICR, у якій гапліодна недостатність викликає лише обмежену ембріональну летальність. Васкулярний фенотип, що спостерігається у цих мутантних мишей, порівнювали з фенотипом, одержаним у мишей дикого типу, у яких шлях передачі сигналу Dll4/Notch селективно придушувався ін'єкцією у склоподібне тіло розчинного інгібітору Dll4, Dll4-Fc або нейтралізованого поліклонального антитіла проти позаклітинного домену Dll4. Для цих експериментів ретина була вибрана як модельна система для вивчення біології Dll4, оскільки ретинальна судинна система розвивається постнатально стереотипним чином, який у високій мірі організований, у часі і у просторовому відношенні.

Модель кисень-індукованої ішемічної ретинопатії (OIR) на мишах являє собою добре охарактеризовану модель патологічної ревазуляризації,

що асоційована зі збільшеною експресією життєво важливого проангіогенного фактора, VEGF (Smith et al. 1994 Invest Ophthalmol Vis Sci 35:101-111; Neely et al. 1998 Am J. Pathol 153:665-670; Saint-Geniez et al. 2004 Int J Dev Biol 48:1045-1058), і, отже, має відношення до патологічного ангиогенезу, пов'язаного з відмінним хворобливим станом (Ferrara et al. 2005 Nature 438:967-974). Нарешті, ретинальна судинна система повністю доступна для експериментальних маніпуляцій, включаючи мікроін'єкції у склоподібне тіло експериментальних речовин.

Описувані нижче експерименти показують, що і при нормальному ретинальному васкулярному розвитку, і у моделі OIR патологічне придушення шляху передачі сигналу Dll4/Notch помітно посилює ангиогенне проростання і викликає утворення щільної первинної капілярної сітки. Відповідно до цього було виявлено, що експресія ендogenous Dll4 особливо помітна у більшості активних областей васкулярного росту як при нормальному розвитку, так і у моделі OIR. Більш того, інгібування Dll4 помітно придушує утворення аномальної судинної системи і перешкоджає непрхідності кровоносних судин і регресії.

Антагоністи Dll4 включають антитіла до Dll4 і його фрагментів, здатні блокувати зв'язування Dll4 з рецептором Notch, наприклад Notch 1; і білки або білкові фрагменти, що включають позаклітинний домен Dll4, який може бути злитий з мультимеризованим компонентом; пептиди і поліпептиди (див., наприклад, публікацію патенту США 2003/0229023 Oliner et al.).

Антитіла до Dll4. Вираз «імуноглобулін або антитіло», як застосовують у даному описі, стосується поліпептиду або білка ссавця, включаючи людину, що включає ділянку структурної області гена імуноглобуліну або його фрагментів, що специфічно зв'язує і розпізнає антиген, який у випадку даного винаходу представляє білок Dll4 або його частину. Якщо призначене антитіло або білок на зразок антитіла використати як терапевтичний засіб для ссавця, ділянки зв'язування імуноглобулінів потрібно одержувати з відповідних імуноглобулінів ссавця. Якщо молекула призначається для нетерапевтичного використання, такого як для діагностики і ELISAs, ділянки зв'язування імуноглобулінів можуть бути одержані або від людини, або від ссавця, який відрізняється від людини, такого як миша. Гени імуноглобулінів людини або фрагменти генів включають константні області κ , λ , α , γ , Δ , ϵ і μ , а також велике число генів варіабельних ділянок імуноглобулінів. Легкі ланцюги класифікуються як κ або λ . Важкі ланцюги класифікуються як γ , μ , α , Δ або ϵ , які, у свою чергу, визначають класи імуноглобулінів IgG, IgM, IgA, IgD і IgE, відповідно. Всередині кожного класу IgG існують різні ізотипи (наприклад, IgG1, IgG2 і т.д.), а також їх алотипи.

Типова структурна одиниця імуноглобуліну (антитіла) IgG людини містить тетрамер. Кожний тетрамер складається з двох ідентичних пар поліпептидних ланцюгів, кожна пара має один легкий ланцюг (близько 25 кДа) і один важкий ланцюг (близько 50-70 кДа). N-кінець кожного ланцюга

визначає варіабельні ділянки приблизно 100-110 або більше амінокислот, відповідальні насамперед за розпізнавання антигену. Терміни «варіабельний легкий ланцюг» (VL) і «варіабельний важкий ланцюг» (VH) стосуються цих легких і важких ланцюгів, відповідно.

Антитіла існують як інтактні імуноглобуліни або як кількість добре охарактеризованих фрагментів, що утворюються при розщепленні різними пептидазами. Наприклад, пепсин розщеплює антитіло нижче дисульфідних зв'язків в області шарніра з утворенням $F(ab)'_2$, димеру Fab, який сам по собі являє собою легкий ланцюг, з'єднаний з VH-CH за допомогою дисульфідного зв'язку. $F(ab)'_2$ може бути відновлений у м'яких умовах для руйнування дисульфідного зв'язку в області шарніра, тим самим перетворюючи димер $F(ab)'_2$ у мономер Fab'. Мономер Fab' являє собою в основному Fab з частиною області шарніра. Незважаючи на те, що різні фрагменти антитіл описуються у термінах розщеплення інтактного антитіла, будь-який фахівець може оцінити, що такі фрагменти можна синтезувати *de novo* або хімічно, або з використанням методології рекомбінантних ДНК. Таким чином, термін антитіло, як застосовують у даному описі, також включає фрагменти антитіл, одержаних або модифікацією цілого антитіла, або таких, синтезованих *de novo* з використанням методології рекомбінантних ДНК, або одержуваний внаслідок аналізу бібліотек, таких як бібліотеки на основі фагу, *E. coli* або дріжджів (див., наприклад, McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-554).

Аналоги або білкові фрагменти DII4. Антагоніст DII4 може бути фрагментом DII4, необов'язково з'єднаним з мультимеризованим компонентом. У конкретних варіантах здійснення, фрагмент DII4 може бути злитий з мультимеризованим компонентом, таким як домен імуноглобуліну, укороченим доменом імуноглобуліну або амінокислотною послідовністю довжиною від 1 до 500 амінокислот, що необов'язково включає принаймні один залишок цистеїну. У переважному варіанті здійснення мультимеризованим компонентом є домен імуноглобуліну, переважно домен Fc, наприклад, Fc людини (SEQ ID NO:5). Білок або фрагмент білка може необов'язково містити сигнальну послідовність, яка може містити будь-яку послідовність, відому фахівцям у галузі, для направлення секреції поліпептиду або білка з клітини, що включає натуральну або синтетичну послідовність. Як правило, сигнальну послідовність вміщують на початку амінокінця злитого білка, за винаходом. Така сигнальна послідовність може бути нативною для клітини, рекомбінантною або синтетичною.

Позаклітинний домен DII4 складається з домену Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) і восьми тандемних повторів, подібних до епідермального фактора росту (EGF). Як правило, домени EGF виявляють розташованими на позиції приблизно 218-251 (домен 1), 252-282 (домен 2), 284-322 (домен 3), 324-360 (домен 4) і 362-400 (домен 5), з доменом DSL у положенні приблизно 173-217 і N-кінцевим доменом у положенні приблизно 27-172 hDII4 (SEQ ID NO:2). У конкретних варіантах здійснення, антагоніст DII4 приблизно містить амінокислоти 27-172,

27-217, 218-400, 218-360, 218-322 або 218-282 послідовності SEQ ID NO:2, необов'язково злиті з hFc (SEQ ID NO:5).

Винахід надає способи лікування, що включають введення суб'єкту ефективної кількості речовини за винаходом. У переважному аспекті речовина значною мірою очищена (наприклад, значною мірою вільна від субстанцій, які обмежують її дію або надають небажані побічні ефекти). Суб'єкт переважно є твариною, наприклад, коровою, свинєю, конем, куркою, кішкою, собакою і т.д., і являє собою, переважно, ссавця, і найбільш переважно, людину. У конкретному варіанті здійснення може бути потрібне введення фармацевтичної композиції за винаходом, локально у ділянку, яка потребує лікування; цього можна досягти, наприклад, і без обмеження, шляхом локальної інфузії при хірургії, місцевому застосуванні, наприклад, шляхом ін'єкції, за допомогою катетера або за допомогою імплантату.

Способи за винаходом можна успішно здійснювати шляхом введення у ділянку, яка потребує лікування, локальним введенням, що включає введення у склоподібне тіло, внутрішньоочне, періокулярне, підкон'юнктивальне, навколосклеральне, під'язикове або місцеве введення.

У різних варіантах здійснення спосіб за винаходом здійснюють з антагоністом DII4, таким як антитіло DII4, у комбінації з однією або декількома додатковими сполуками або терапіями, або медичними процедурами. Наприклад, відповідні терапевтичні засоби для застосування у комбінації, або поперемінно, або одночасно, включають злиті білки, здатні зв'язувати та інгібувати активність м'язового ендотеліального фактора росту (VEGF) (див. патенти США 7070959 і 7087411), імуносупресивні засоби, такі як кортикостероїди, дексаметазон, циклоспорин А, FK506 або антиметаболічні речовини (див. Barker, NH, et al., (2000) *Clin Exp Ophthalmol* 28:357-360). Інші придатні терапевтичні засоби для використання у комбінації, або поперемінно, або одночасно, з антагоністом DII4 за винаходом, можуть включати речовини, які можуть блокувати біологічну активність інших членів сімейства VEGF, таких як VEGF-C і VEGF-D.

Наведені нижче приклади використані для того, щоб надати фахівцям у даній галузі повне розкриття і опис того, як підготувати і застосувати способи і композиції за винаходом, і не призначені для обмеження обсягу того, що автори розцінюють як свій винахід. Були зроблені зусилля для забезпечення точності стосовно використаних чисельних значень (наприклад, кількості, площові вимірювання, і т.д.), однак, потрібно брати до уваги деякі експериментальні помилки і відхилення.

Приклад 1

Ефект генетичної делеції однієї алелі DII4 на проростання кровоносних судин у ретина л'ьній судинній системі, що розвивається.

Було проведено дослідження для визначення ефектів часткової генетичної недостатності DII4 на проростання кровоносних судин під час нормального розвитку ретинального ангиогенезу.

Тварини. Технологія Velocigene™ (Valenzuela

et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:652-9; Патент США 6586251) була використана для заміщення повної кодувочої області Dll4 репортерним геном β -галактозидази у гібридних ембріональних стовбурових клітинах миші C57BL/6.129. Химерні самці були схрещені з самками ICR. У цьому дослідженні були використані миші Dll4^{+lacZ}, зворотно схрещені протягом 3 генерацій з ICR (87,5% ICR).

Гістохімія та імунозабарвлення. Дитинчат миші гуманно умертвляли на P7. Очі вилущували і ретини відділяли, фіксували ніч з 4% параформальдегідом, забарвлювали FITC-міченим лектином I Griffonia simplicifolia (GS) (Vector Laboratories, Burlingame, CA), і готували мікропрепарати. Зображення були зроблені з використанням мікроскопа Nikon (Melville, NY).

Кількісний аналіз. Вимірювання проводили з використанням програмного забезпечення Scion Image. Кожна експериментальна точка була одержана, щонайменше, у трьох повторах. Для оцінки статистичної значимості були використані t-тест Стьюдента і двохфакторний дисперсійний аналіз.

Результати. Периферичне переплетення було більш щільним у мишей Dll4^{+lacZ}, ніж у однопріплідних дитинчат дикого типу. Зображення високої якості демонстрували, що щільне периферичне переплетення у ретинах мишей Dll4^{+lacZ} складалося з капілярів, які були більші у діаметрі, більш сильно взаємозв'язані і понадміру з'єднані, тому у деяких ділянках судини зросталися з утворенням синцитію, і, на додаток, було набагато більше відростків на фронті росту (Фіг.1); також спостерігали філоподію у більш внутрішніх частинах переплетення з більш ніж нормальною частотою. Кількісний аналіз показав, що у порівнянні з контролем дикого типу ретини мишей Dll4^{+lacZ} продемонстрували 68% збільшення числа відростків на фронті росту поверхневої ретинальної судинної системи (Фіг.1), а також більш ніж двократне збільшення числа капілярних взаємозв'язків на одиницю ділянки, що приводить до значного збільшення м'язового покриття. Незважаючи на відмічені морфологічні зміни, внутрішньом'язова ін'єкція міченого флуоресцеїном лектину повністю заповнила поверхневе васкулярне сплетення, що розвивається, за винятком філоподії, що простягається від кінця клітин у мишей Dll4^{+lacZ}, як і у мишей дикого типу, показуючи, що всі компоненти судинної системи, що розвивається, мали просвіти і були функціональними.

Приклад 2

Ефект інгібування Dll4/Notch Dll4-Fc або анти-телом анти-Dll4 на розвиток ретинальної судинної системи.

Було проведено дослідження для визначення ефектів патологічного інгібування шляху передачі сигналу Dll4/Notch на проліферацію ендотеліальних клітин і проростання кровоносних судин під час ретинального ангиогенезу, що нормально розвивається.

Антитіла і реагенти. Dll4-Fc містить позаклітинний домен Dll4 миші або людини і частину Fc IgG людини. Dll4-Fc був експресований у клітинах CHO і афінно очищений з використанням хроматографії з білком А. Антитіло анти-Dll4 одержували

шляхом імунізації кроликів рекомбінантним mDll4-hFc.

Антисироватку перед використанням частково очищали з використанням хроматографії з білком А.

Тварини. Миші C57/Bl6 (Taconic) були використані для вивчення ефекту Dll4-Fc або нейтралізуючого Dll4 антитіла на розвиток ретинальної судинної системи. Мікроін'єкції у склоподібне тіло. Мікроін'єкції у склоподібне тіло (30-100 нл) досліджуваних сполук проводили між екватором і корональною кінцівкою за допомогою наноінжектора Drummond Scientific (BroPA), оснащеного скляною гоною.

Мічення BrdU. Проліферуючі клітини мітили введенням BrdU (1 мг/кг в.ч.) через 20 годин після мікроін'єкції у склоподібне тіло hFc або Dll4-Fc. Ретини збирали на 4 години пізніше і забарвлювали антитілами anti-BrdU (Dako North America, Inc., Carpinteria, CA) і VE-Cadherin (BD PharMingen, San Diego, CA).

Результати. Для вивчення ефекту локальної інтратетинальної недостатності при передачі сигналу Dll4/Notch, і не вторинного стосовно системного порушення, що не детектується, розчинний варіант Dll4 (позначений Dll4-Fc), який зв'язується з рецепторами Notch без їх активації, блокуючи тим самим дії ендогенного Dll4, або нейтралізуюче поліклональне антитіло, специфічне для позаклітинного домену Dll4, ін'єктували у склоподібне тіло мишей дикого типу. Через три дні після введення у склоподібне тіло будь-якого блокатора Dll4 ретинальні судини проявляли морфологічні зміни, які мають подібність до васкулярних порушень, виявлених у мишей Dll4^{+lacZ}, що включають різко збільшену щільність кровоносних судин і розмір судин. Більш того, ці характерні морфологічні зміни відбуваються швидко, виразно проявляючись протягом 24 годин.

Мічення BrdU також демонструє збільшену проліферацію ендотеліальних клітин протягом 24 годин блокади Dll4 (Фіг.2). ~17% збільшення швидкості проліферації, що спостерігається, може дати більш ніж 50% збільшення числа клітин протягом 3-4 часів подвоєння.

Приклад 3

Ефект Dll4-Fc і антитіла анти-Dll4 на ретинальну васкуляризацію, перфузію і васкулярні порушення у мишей з OIR.

Було проведено дослідження для визначення ефектів Dll4-Fc і антитіла анти-Dll4 на ріст ретинальних судин, утворення васкулярних порушень і ретинальну перфузію при кисень-індукованій ішемічній ретинопатії (OIR).

Для визначення того, чи грає шлях передачі сигналу Dll4/Notch роль у патологічному ангиогенезі, а також під час нормального розвитку, була використана модель OIR. У моделі OIR вплив на дитинчат мишей гіпероксії на P7 приводить до швидкої облітерації капілярів у головній ретині. При подальшому поверненні до кімнатного повітря на P12 аваскулярна зона стає строго гіпоксичною, що у свою чергу викликає широку аномальну ре-васкуляризацію, що характеризується ектопічним ростом судин у склоподібному тілі (епіретинальні

васкулярні «пучки») і утворенням аномальних артеріовенозних шунтів; головні частини ретини залишаються значною мірою аваскулярними протягом тривалого періоду часу.

Тварини і модель OIR. Миші C57/Bl6 (Taconic) були використані для вивчення ефекту Dll4-Fc або нейтралізуючого Dll4 антитіла на ретинальну ре-васкуляризацію в OIR. OIR була одержана наступним способом, розробленим Smith et al. (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1994, 35:101-111). Стисло, дитинчат мишей і їх самок вміщували в атмосферу 75% кисню від постнатальних днів (P7 до P12), і потім повертали до кімнатного повітря. Вплив гіпероксії індукує швидку вазооблітерацію у головній ретині. Коли мишей повертали до кімнатного повітря (P12), втрата судин у головній ретині приводила до сильної гіпоксії/ішемії, яка, у свою чергу, стимулює описані вище патологічні васкулярні зміни.

Для мічення доступних кровоносних судин 50 мл міченого Texas red лектину *Lycopersicon esculentum* (LE) (1 мг/мл; Vector Laboratories, CA) ін'єктували у лівий шлуночок серця і давали циркулювати протягом 5 хв.

Результати. Інгібування Dll4/Notch Dll4-Fc або антитілом анти-Dll4 поліпшувало патологічну ре-васкуляризацію (Фіг.3A-B), стимулювало ріст нових кровоносних судин (Фіг.4A-B) і поліпшувало ретинальну реперфузію (Фіг.5).

Dll4-Fc або антитіло анти-Dll4, або контрольний білок (hFc) ін'єктували у склоподібне тіло на P13, через день після повернення до кімнатного повітря, значно пізніше завершення вазооблітерації. Коли ретини оцінювали на P17, введення Dll4-Fc або антитіла анти-Dll4 драматично придушувало ектопічний ріст патологічних неоваскулярних пучків у склоподібному тілі (Фіг.1), а також перешкоджало утворенню аномальних артеріовенозних шунтів. Області, охоплені неоваскулярними пучками, зменшилися на 43% у ретинах, оброблених Dll4-Fc, і на 85% у ретинах, оброблених антитілом анти-Dll4, в обох випадках у порівнянні з обробленими hFc контрольними ретинами.

Більш того, було виявлено, що Dll4-Fc і антитіло анти-Dll4 стимулюють більш широке проростання нових судин з капілярів і вен, які межують з аваскулярною зоною, що приводить до більш швидкого повторного росту кровоносних судин у головній ретині, де судинна система була виснажена, зменшуючи таким чином аваскулярну ретинальну область (Фіг.4A-B). Аваскулярні області зменшилися на 43% у ретинах, оброблених Dll4-Fc, і на 63% у ретинах, оброблених антитілом анти-Dll4. Особливо значним був широкий повторний ріст капілярів, що походять з вен в аваскулярній зоні оброблених Dll4-Fc ретин. Таким чином, ослаблення сигнального шляху Dll4/Notch сприяє поширенню нових судинних відростків вздовж ретинальної поверхні, і ослаблює утворення епіретинальної ре-васкуляризації, що приводить до більш швидкого повторного утворення поверхневого васкулярного сплетення. Знову утворені судини були функціональними і проявляли поліпшену ретинальну повторну перфузію, що підтверджується 45% зменшенням неперфузної

області в оброблених Dll4-Fc ретинах (Фіг.5).

Приклад 4

Ефект Dll4-Fc і антитіла анти-Dll4 на ретинальну гіпоксію/ішемію у моделі OIR.

Було проведено дослідження для визначення ефектів Dll4-Fc і антитіла анти-Dll4 на ретинальну гіпоксію/ішемію у моделі OIR патологічної ре-васкуляризації.

Надмірний ріст кровоносних судин за визначених обставин може перешкоджати нормальній циркуляції крові і зменшувати оксигенацію тканини. Для перевірки того, чи може інгібування Dll4/Notch поліпшувати оксигенацію тканини, для детектування гіпоксії тканини і визначення ефекту впливу Dll4-Fc на ретинальну гіпоксію/ішемію у неінвазивному тесті був використаний HYPOXYPROBE™-1 (Chemicon). HYPOXYPROBE™-1 ін'єктували внутрішньочеревинно у кількості 100 мг/кг за одну годину до збору ретин для оцінки.

Результати. Ріст функціональних нових судин, що йде за введенням інгібіторів Dll4/Notch у склоподібне тіло, ефективно зменшував гіпоксію/ішемію тканини, що доводиться 69% і 30% зменшенням HYPOXYPROBE-позитивних областей у ретинах, оброблених Dll4-Fc або антитілом анти-Dll4, відповідно. (Фіг.6A-B).

Приклад 5

Генетична делеція однієї алелі Dll4 зменшує індуковану гіпероксією вазооблітерацію.

Було проведено дослідження для визначення ефектів часткової генетичної недостатності Dll4 на індуковану гіпероксією регресію кровоносних судин.

Тварини. Миші $Dll4^{+/lacZ}$, зворотно схрещені протягом 3 генерацій з ICR (87,5% ICR), були одержані як описано вище. Через рецесивну (rd/rd) мутацію ретинальний шар фоторецепторних клітин починає утворюватися на P12 у мишей ICR. Отже, для усунення можливих вторинних ефектів втрати фоторецептора на ретинальний судинний систему, для оцінки пізніх стадій ретинального розвитку і для всіх OIR-експериментів миші $Dll4^{+/lacZ}$ (87,5% ICR) були зворотно схрещені з C57BL/6 для одержання мишей Rd/rd, які не проявляли дегенерацію фоторецептора.

Дитинчат мишей вміщували в атмосферу 75% кисню від постнатальних днів (P7 до P12). Ретини збирали і ретинальну судинну систему аналізували у мікропрепаратах.

Результати. Зменшена експресія Dll4 у ретинальній судинній системі мишей $Dll4^{+/lacZ}$ частково перешкоджає індукованій гіпероксією втраті ретинальних кровоносних судин (Фіг.7). У моделі OIR вплив гіпероксії на дитинчат миші на P7 приводить до швидкої непрохідності і облітерації капілярів у головній ретині. Для визначення того, чи може інгібування Dll4/Notch мати захисний ефект на кровоносні судини, був проаналізований ефект часткової генетичної дефектності у мишей $Dll4^{+/lacZ}$ на індуковану гіпероксією вазооблітерацію. Оцінювання тварин на P12 (з тим, щоб оцінити ступінь гіпероксидної вазооблітерації) дозволило виявити, що вазооблітерація зменшилась на 40% у мишей $Dll4^{+/lacZ}$, у порівнянні з однопиплідними контрольними тваринами дикого типу, що дозволило

припустити, що інгібітори Dll4 можуть захищати існуючі кровоносні судини від регресії.

Приклад 6

Ефекти Dll4-Fc і антитіла анти-Dll4 на індуковану гіпероксією вазооблітерацію.

Було проведено дослідження для визначення ефектів інгібування Dll4/Notch Dll4-Fc і антитілом анти-Dll4 на індуковану гіпероксією регресію кровоносних судин.

Тварини. Миші C57/Bl6 (Тасопіс) були використані для вивчення ефекту Dll4-Fc або нейтралізуючого Dll4 антитіла на кисень-індуковану ретинальну вазооблітерацію. Мікроін'єкції у склоподібне тіло досліджуваних сполук проводили у постнатальний день 8. У постнатальний день 9 дитинчат вміщували в атмосферу 75% кисню. Ретини збирали через 24 години і ретинальну судинну систему аналізували у мікропрепаратах.

Результати. Ін'єкція у склоподібне тіло Dll4-Fc або антитіла анти-Dll4 істотно зменшувала області облітеруючої судинної системи на 97% і 41%, відповідно (Фіг.8A-B).

Приклад 7

Ефекти Dll4-Fc і антитіла анти-Dll4 на індуковану гіпероксією непрохідність кровоносних судин.

Було проведено дослідження для визначення ефектів інгібування Dll4/Notch Dll4-Fc і антитілом

анти-Dll4 на індуковану гіпероксією непрохідність кровоносних судин. Всі процедури проводили як описано вище.

Обробка Dll4-Fc і антитілом анти-Dll4 зменшувала неперфузійні ретинальні області на 40% і 29%, відповідно (Фіг.9A-B).

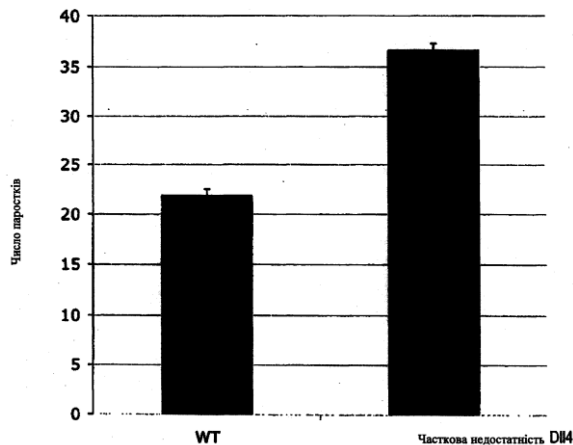
Приклад 8

Ефекти системного введення Dll4-Fc на індуковану гіпероксією регресію кровоносних судин.

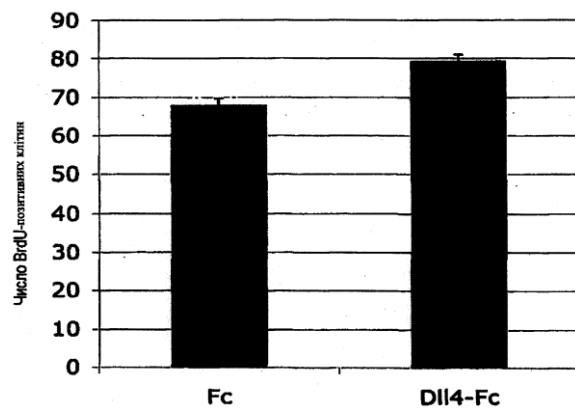
Було проведено дослідження для визначення ефектів системного впливу Dll4-Fc на індуковану гіпероксією регресію кровоносних судин.

4,1 мкг hDll4-hFc або 5 мкг контрольного білка hFc людини ін'єктували у склоподібне тіло (ITV) або hDll4-hFc ін'єктували внутрішньочеревинно у дозі 25 мг на кг маси тіла на P7. Дитинчат вміщували в атмосферу 75% кисню на P8 і ретинальну судинну систему аналізували на P9. Всі інші процедури здійснювали як описано вище.

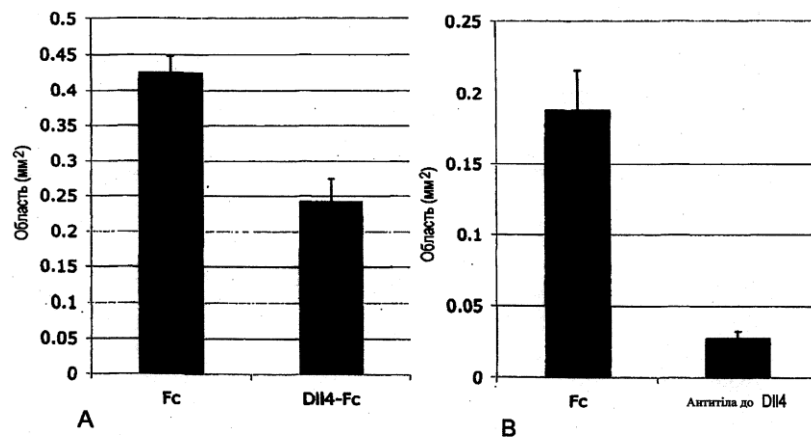
Результати. Як локальне (у склоподібне тіло), так і системне (внутрішньочеревинне) введення Dll4-Fc зменшувало області облітеруючої судинної системи на 86% і 56%, відповідно, свідчаючи, що, незалежно від способу введення, інгібітори Dll4 можна ефективно застосовувати для захисту кровоносних судин від регресії (Фіг.10).



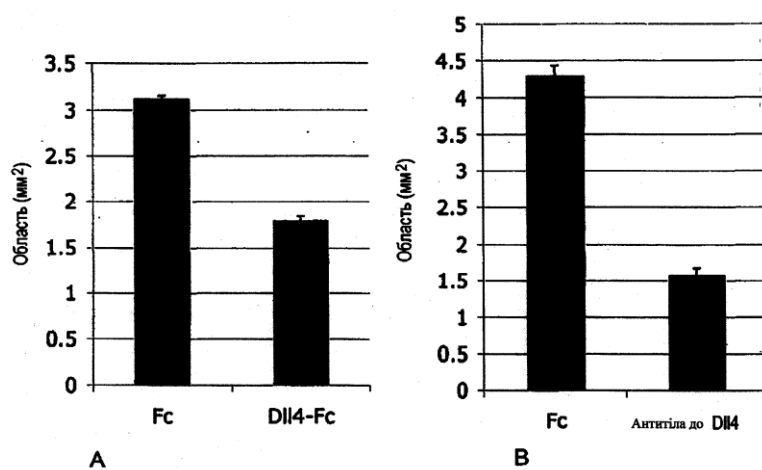
Фіг. 1



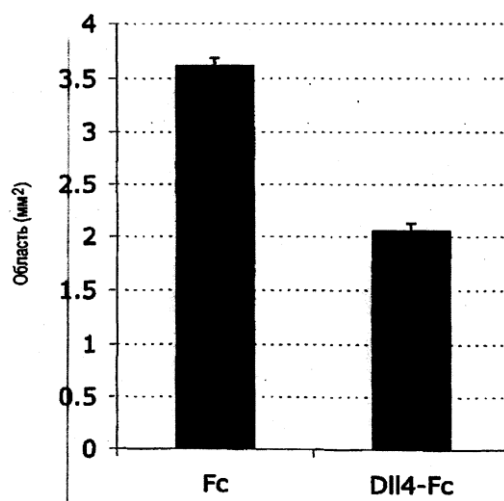
Фіг. 2



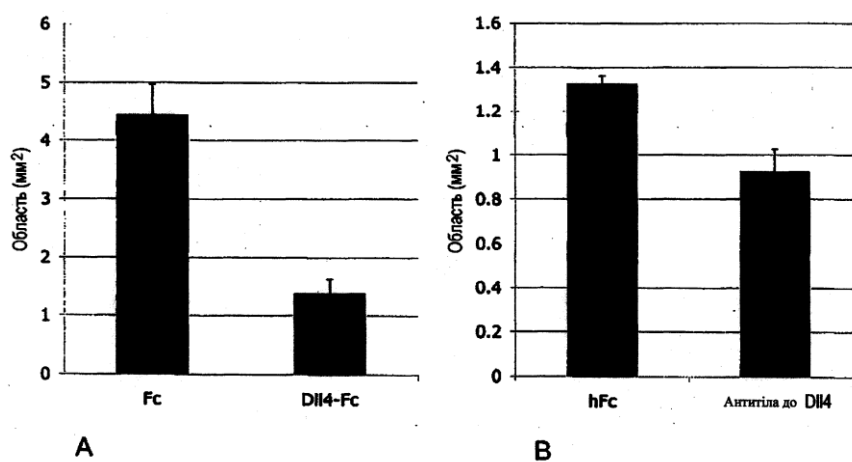
Фіг. 3



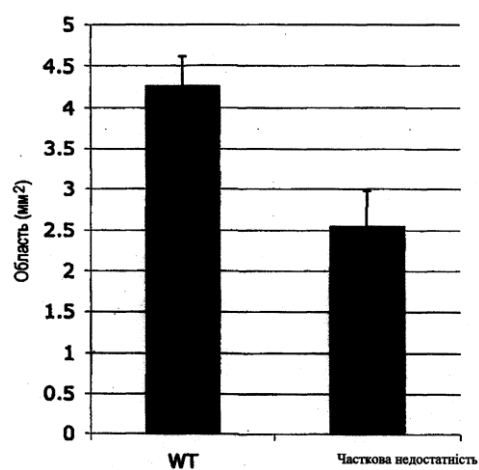
Фиг. 4



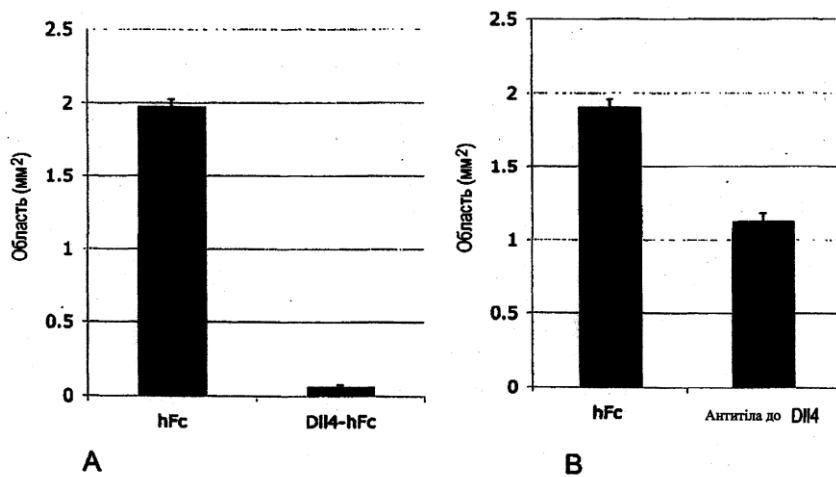
Фиг. 5



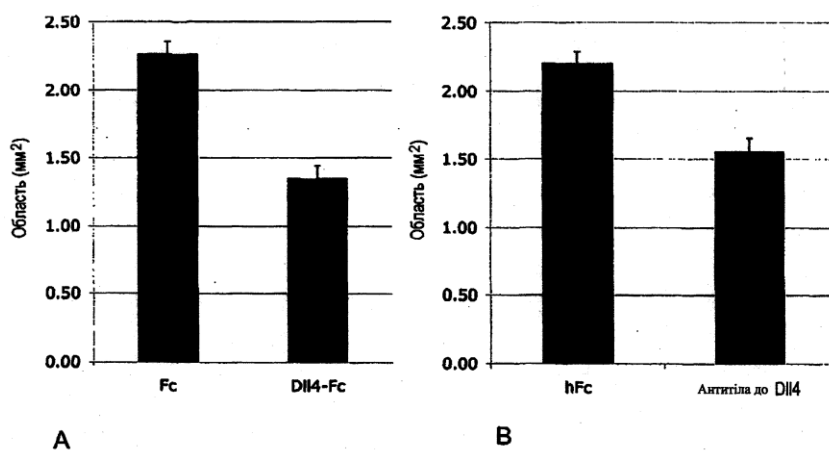
Фиг. 6



Фіг. 7



Фіг. 8



Фіг. 9

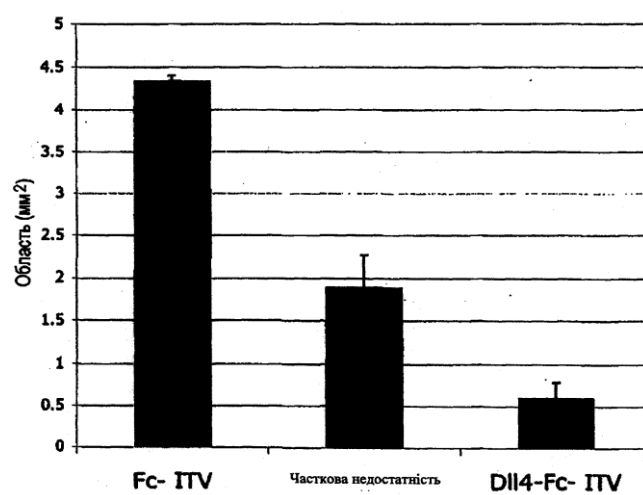


Fig. 10

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc

<120> Терапевтичні способи лікування васкулярних захворювань очей антагоністами D114

<130> 3090A-WO

<140> To be assigned

<141> 2007-08-07

<150> 60/836,003

<151> 2006-08-07

<160> 5

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2058

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

atggcgccag cgtcccgag cgcctctggc tggcgctac tgctgctggt ggcaactttgg 60
cagcagcgcg cggccggctc cggcgctctc cagctgcagc tgcaggaggt catcaacgag 120
cgcgcgctac tggccagtgg gcggccttgc gagcccggt gccggacttt cttccgcgtc 180
tgctttaagc acttccaggc ggtcgtctcg cccggacct gcaccttcgg gacctctcc 240
acgcccgtat tgggaccaa ctctctcgct gtccgggacg acagtagcgg cggggggcgc 300
aaccctctcc aactgccctt caatttcacc tggccgggta ccttctcgct catcatcgaa 360
gcttggcacg cgcaggaga cgacctgcgg ccagaggcct tgccaccaga tgcaactc 420
agcaagatcg ccatccaggg ctccctagct gtgggtcaga actggttatt ggatgagcaa 480
accagcacc cacaaggct gcgctactct taccgggtca tctgcagtga caactactat 540
ggagacaact gctccgcct gtgcaagaag cgaatgacc acttcggcca ctatgtgtgc 600
cagccagatg gcaacttgtc ctgcctgccc ggttgactg gggaatattg ccaacagcct 660
atctgtcttt cgggctgtca tgaacagaat ggctactgca gcaagccagc agagtgcctc 720
tgccgcccag gctggcagg ccggctgtgt aacgaatgca tccccacaa tggctgtcgc 780
cacggcacct gcagcactcc ctggcaatgt acttgtgatg agggctgggg aggcctgttt 840
tgtgaccaag atctcaacta ctgacccac cactcccat gcaagaatgg ggcaacgtgc 900
tccaacagtg ggcagcgaag ctacacctgc acctgtcgcc caggctacac tgggtgggac 960
tgtgagctgg agctcagcga gtgtgacagc aaccctgtc gcaatggagg cagctgtaag 1020
gaccaggagg atggctacca ctgcctgtgt cctccgggct actatggcct gcattgtgaa 1080
cacagcacct tgagctgcgc cgactcccc tgcttcaatg ggggtcctg ccgggagcgc 1140
aaccaggggg ccaactatgc ttgtgaatgt cccccaact tcaccggctc caactgcgag 1200
aagaagtgag acaggtgcac cagcaacccc tgtgccaacg ggggacagt cctgaaccga 1260
ggtccaagcc gcatgtgccc ctgcccgtct ggattcacgg gcacctactg tgaactccac 1320
gtcagcgaat gtgcccgtaa cccttgccgc caggtgggca cttgccatga cctggagaat 1380
gggctcatgt gcacctgccc tgccggcttc tctggccgac gctgtgaggt gcggacatcc 1440
atcgatgcct gtgcctcgag tccctgtctc aacagggcca cctgtacac cgacctctcc 1500
acagacacct ttgtgtgcaa ctgccttat ggcttgtgtg gcagccgctg cgagttcccc 1560
gtgggcttgc cggccagctt cccctgggtg gccgtctcgc tgggtgtggg gctggcagtg 1620
ctgctggtag tctgggcat ggtggcagt gctgtcgggc agctgcggct tcgacggccg 1680
gacgacggca gcagggaag catgaacaac ttgtcggaat tccagaagga caacctgatt 1740
cctgcccggc agcttaaaaa cacaaaccag aagaaggagc tggaaagtga ctgtggcctg 1800
gacaagtcga actgtggcaa acagcaaac cacacattgg actataatct ggccccaggg 1860
ccctggggc gggggacat gccaggaaag tttcccaca gtgacaagag cttaggagag 1920
aaggcgccac tgcgggtaca cagtgaagag ccagagtgtc ggatatcagc gatatgctcc 1980
ccaggggact ccatgtacca gtctgtgtgt ttgatatcag aggagaggaa tgaatgtgtc 2040
attgccacgg aggtataa

```

2058

<210> 2

<211> 685

<212> B1JOK

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Ala Ala Ala Ser Arg Ser Ala Ser Gly Trp Ala Leu Leu Leu Leu
 1          5          10          15
Val Ala Leu Trp Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Val Phe Gln Leu
 20          25          30
Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly Val Leu Ala Ser Gly Arg
 35          40          45
Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu Lys His
 50          55          60
Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys Thr Phe Gly Thr Val Ser
 65          70          75          80
Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala Val Arg Asp Asp Ser Ser
 85          90          95
Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp Pro
100          105          110
Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp His Ala Pro Gly Asp Asp
115          120          125
Leu Arg Pro Glu Ala Leu Pro Pro Asp Ala Leu Ile Ser Lys Ile Ala
130          135          140
Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Gln Asn Trp Leu Leu Asp Glu Gln
145          150          155          160
Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser Tyr Arg Val Ile Cys Ser
165          170          175
Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg Leu Cys Lys Lys Arg Asn
180          185          190
Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro Asp Gly Asn Leu Ser Cys
195          200          205
Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys Gln Gln Pro Ile Cys Leu Ser
210          215          220
Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser Lys Pro Ala Glu Cys Leu
225          230          235          240
Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ile Pro His
245          250          255
Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Thr Pro Trp Gln Cys Thr Cys
260          265          270
Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp Gln Asp Leu Asn Tyr Cys
275          280          285
Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ala Thr Cys Ser Asn Ser Gly
290          295          300
Gln Arg Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Arg Pro Gly Tyr Thr Gly Val Asp
305          310          315          320
Cys Glu Leu Glu Leu Ser Glu Cys Asp Ser Asn Pro Cys Arg Asn Gly
325          330          335
Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asp Gly Tyr His Cys Leu Cys Pro Pro
340          345          350
Gly Tyr Tyr Gly Leu His Cys Glu His Ser Thr Leu Ser Cys Ala Asp
355          360          365
Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg Glu Arg Asn Gln Gly Ala
370          375          380
Asn Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro Asn Phe Thr Gly Ser Asn Cys Glu
385          390          395          400
Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln
405          410          415
Cys Leu Asn Arg Gly Pro Ser Arg Met Cys Arg Cys Arg Pro Gly Phe
420          425          430
Thr Gly Thr Tyr Cys Glu Leu His Val Ser Asp Cys Ala Arg Asn Pro
435          440          445
Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu Glu Asn Gly Leu Met Cys
450          455          460
Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg Cys Glu Val Arg Thr Ser
465          470          475          480

```

Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe Asn Arg Ala Thr Cys Tyr
 485 490 495
 Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe Val Cys Asn Cys Pro Tyr Gly Phe
 500 505 510
 Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly Leu Pro Pro Ser Phe Pro
 515 520 525
 Trp Val Ala Val Ser Leu Gly Val Gly Leu Ala Val Leu Leu Val Leu
 530 535 540
 Leu Gly Met Val Ala Val Ala Val Arg Gln Leu Arg Leu Arg Arg Pro
 545 550 555 560
 Asp Asp Gly Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn Leu Ser Asp Phe Gln Lys
 565 570 575
 Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys Asn Thr Asn Gln Lys Lys
 580 585 590
 Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys Ser Asn Cys Gly Lys Gln
 595 600 605
 Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala Pro Gly Pro Leu Gly Arg
 610 615 620
 Gly Thr Met Pro Gly Lys Phe Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly Glu
 625 630 635 640
 Lys Ala Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile Ser
 645 650 655
 Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys Leu Ile
 660 665 670
 Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val
 675 680 685

<210> 3

<211> 3427

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 3

ctcgcaggct aggaaccgga ggccaagagc tgcagccaaa gtcacttggg tgcagtgtac 60
 tccctcacta gcccgctcga gaccctagga tttgctccag gacacgtact tagagcagcc 120
 accgcccagt cgccctcacc tggattacct accgaggcat cgagcagcgg agtttttgag 180
 aaggcgacaa gggagcagcg tcccagaggg aatcagcttt tcaggaaact ggctggcaga 240
 cgggacttgc gggagagcga catccctaac aagcagattc ggagtcccg agtggagagg 300
 acaccccaag ggaatgacgc tgcgtcccg agcgctctgc gctgggcgct actgctgctg 360
 gcgggtactgt ggccgcagca gcgcgctgcg ggctccggca tcttcagct gcggctgcag 420
 gaggctcgtc accagcgcg tatgctggcc aatgggcagt cctgcgaacc gggctgccgg 480
 actttcttcc gcatttgcct taagcacttc caggcaacct tctccgaggg accctgcacc 540
 tttggcaatg tctccacgcc ggtattgggc accaactcct tgcgtcgtcag ggacaagaat 600
 agcggcagtg gtgcgaaccc tctgcagttg ccttcaatt tcacctggcc gggaaccttc 660
 tcaactcaaca tccaagcttg gcacacaccg ggagacgacc tgcggccaga gacttcgcca 720
 ggaaactctc tcatcagcca aatcatcatc caaggctctc ttgctgtggg taagatttgg 780
 cgaacagacg agcaaatga caccctcacc agactgagct actcttaccg ggtcatctgc 840
 agtgacaact actatggaga gagctgttct cgcctatgca agaagcgca tgaccacttc 900
 ggacattatg agtgccagcc agatggcagc ctgtcctgcc tgcggggctg gactgggaag 960
 tactgtgacc agcctatag tctttctggc tgtcatgagc agaatggta ctgcagcaag 1020
 ccagatgagt gcatctgccg tccaggttgg cagggtcgcc tgtgcaatga atgtatcccc 1080
 cacaatggct gtcgtcatgg cacctgcagc atccctggc agtgtgcctg cgatgaggga 1140
 tggggaggct tgttttgtga ccaagatctc aactactgta ctaccactc tccgtgcaag 1200
 aatggatcaa cgtgttccaa cagtgggcca aagggttata cctgcacctg tctccaggc 1260
 tacactgggt agcactgtga gctgggactc agcaagtgtg ccagcaacct ctgtcgaaat 1320
 ggtggcagct gtaaggacca ggagaatagc taccactgcc tgtgtccccc aggctactat 1380
 ggccagcact gtgagcatag taccttgacc tgtgcggact caccctgctt caatgggggc 1440
 tcttgccggg agcgcaacca ggggtccagt tatgcctgcg aatgcccccc caactttacc 1500
 ggctctaact gtgagaagaa agtagacagg tgtaccagca acccgtgtgc caatggaggc 1560
 cagtgccctga acagaggtcc aagccgaacc tgccgctgcc ggctgggatt cacaggcacc 1620
 cactgtgaac tgcacatcag cgattgtgcc cgaagtcct gtgcccacgg gggcacttgc 1680
 cacgatctgg agaattgggc tgtgtgcacc tgcccgcgtg gcttctctgg caggcgctgc 1740
 gaggtgcgga taaccacga tgcctgtgcc tccggaccct gcttcaatgg ggccacctgc 1800

```

tacactggcc tctcccaaaa caacttcgtc tgcaactgtc cttatggctt tgtgggcagc 1860
cgctgcgagt ttcccgtggg cttgccaccc agcttcccct gggtagctgt ctccgtgggc 1920
tgggggctag tggtagctgt ggtgctgtgt gtcagtgtgt tagtggctgt gcggcagctg 1980
cggcttcgga ggcccgatga cgagagcagg gaagccatga acaatctgtc agacttccag 2040
aaggacaacc taatccctgc cgccagctc aaaaacacaa accagaagaa ggagctggaa 2100
gtggactgtg gtctggacaa gtccaattgt ggcaactgc agaaccacac attggactac 2160
aatctagccc cgggactcct aggacggggc agcatgcctg ggaagtatcc tcacagtgc 2220
aagagcttag gagagaaggt gccacttcgg ttacacagtg agaagccaga gtgtcgaata 2280
tcagccattt gctctcccag ggactctatg taccaatcag tgtgtttgat atcagaagag 2340
aggaacgagt gtgtgattgc cacagaggta taaggcagga gcctactcag acaccagct 2400
ccggcccagc agctgggccc tcttctgca ttgtttacat tgcatcctgt atgggacatc 2460
tttagtatgc acagtgtgc tctgcggagg agggaggaaat ggcatgaact gaacagactg 2520
tgaacccgcc aagagttgca ccggctctgc acacctccag gagtctgcct ggcttcagat 2580
gggcagcccc gcccaaggaa cagagttgag gagttagagg agcatcagtt gagctgatat 2640
ctaaggtgcc tctcgaactt ggacttgctc tgccaacagt ggtcatcatg gagctcttga 2700
ctgttctcca gagagtggca gtggccctag tgggtcttgg cgctgctgta gctcctgtgg 2760
gtcatctgat ttccaaagtg cctttgcccga gactccatcc tcacagctgg gcccaaatga 2820
gaaagcagag agggagcttg caaaggatag gcctcccgca ggcagaacag ccttggagtt 2880
tgccattaag caggagctac tctgcagggt aggaaagccc gaggagggga cacgtgtgac 2940
tctgcctcc aaccccagca ggtgggtgct cactgcagc ctctaggcaa gagtgtgtcc 3000
ttcccttggt cctggtgcct ctgggctcat gtgaacagat gggcttaggg caccgccctt 3060
ttgcccagca ggggtacagg cctcactggg gagctcaggg ccttcatgct aaactcccaa 3120
taaggagat ggggggaagg gggctgtggc ctaggccctt ccctccctca caccattttt 3180
tgggcccttg agcctgggct ccaccagtgc ccactgttgc cccgagacca accttgaagc 3240
cgattttcaa aaatcaataa tatgaggttt tgtttttag tttattttgg aatctagtat 3300
tttgataatt taagaatcag aagcactggc ctttctacat tttataacat tattttgtat 3360
ataatgtgta tttataatat gaaacagatg tgtacataaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3420
aaaaaaa

```

<210> 4

<211> 686

<212> BIJOK

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Met Thr Pro Ala Ser Arg Ser Ala Cys Arg Trp Ala Leu Leu Leu Leu
1          5          10          15
Ala Val Leu Trp Pro Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Ile Phe Gln
20          25          30
Leu Arg Leu Gln Glu Phe Val Asn Gln Arg Gly Met Leu Ala Asn Gly
35          40          45
Gln Ser Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Ile Cys Leu Lys
50          55          60
His Phe Gln Ala Thr Phe Ser Glu Gly Pro Cys Thr Phe Gly Asn Val
65          70          75          80
Ser Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Val Val Arg Asp Lys Asn
85          90          95
Ser Gly Ser Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp
100         105         110
Pro Gly Thr Phe Ser Leu Asn Ile Gln Ala Trp His Thr Pro Gly Asp
115         120         125
Asp Leu Arg Pro Glu Thr Ser Pro Gly Asn Ser Leu Ile Ser Gln Ile
130         135         140
Ile Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Lys Ile Trp Arg Thr Asp Glu
145         150         155         160
Gln Asn Asp Thr Leu Thr Arg Leu Ser Tyr Ser Tyr Arg Val Ile Cys
165         170         175
Ser Asp Asn Tyr Tyr Gly Glu Ser Cys Ser Arg Leu Cys Lys Lys Arg
180         185         190
Asp Asp His Phe Gly His Tyr Glu Cys Gln Pro Asp Gly Ser Leu Ser
195         200         205
Cys Leu Pro Gly Trp Thr Gly Lys Tyr Cys Asp Gln Pro Ile Cys Leu
210         215         220
Ser Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser Lys Pro Asp Glu Cys

```



```

225          230          235          240
Ile Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ile Pro
          245          250          255
His Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Ile Pro Trp Gln Cys Ala
          260          265          270
Cys Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp Gln Asp Leu Asn Tyr
          275          280          285
Cys Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ser Thr Cys Ser Asn Ser
          290          295          300
Gly Pro Lys Gly Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Pro Gly Tyr Thr Gly Glu
305          310          315          320
His Cys Glu Leu Gly Leu Ser Lys Cys Ala Ser Asn Pro Cys Arg Asn
          325          330          335
Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asn Ser Tyr His Cys Leu Cys Pro
          340          345          350
Pro Gly Tyr Tyr Gly Gln His Cys Glu His Ser Thr Leu Thr Cys Ala
          355          360          365
Asp Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg Glu Arg Asn Gln Gly
          370          375          380
Ser Ser Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro Asn Phe Thr Gly Ser Asn Cys
385          390          395          400
Glu Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly
          405          410          415
Gln Cys Leu Asn Arg Gly Pro Ser Arg Thr Cys Arg Cys Arg Pro Gly
          420          425          430
Phe Thr Gly Thr His Cys Glu Leu His Ile Ser Asp Cys Ala Arg Ser
          435          440          445
Pro Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu Glu Asn Gly Pro Val
          450          455          460
Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg Cys Glu Val Arg Ile
465          470          475          480
Thr His Asp Ala Cys Ala Ser Gly Pro Cys Phe Asn Gly Ala Thr Cys
          485          490          495
Tyr Thr Gly Leu Ser Pro Asn Asn Phe Val Cys Asn Cys Pro Tyr Gly
          500          505          510
Phe Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly Leu Pro Pro Ser Phe
          515          520          525
Pro Trp Val Ala Val Ser Leu Gly Val Gly Leu Val Val Leu Leu Val
          530          535          540
Leu Leu Val Met Val Val Val Ala Val Arg Gln Leu Arg Leu Arg Arg
545          550          555          560
Pro Asp Asp Glu Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn Leu Ser Asp Phe Gln
          565          570          575
Lys Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys Asn Thr Asn Gln Lys
          580          585          590
Lys Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys Ser Asn Cys Gly Lys
          595          600          605
Leu Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala Pro Gly Leu Leu Gly
          610          615          620
Arg Gly Ser Met Pro Gly Lys Tyr Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly
625          630          635          640
Glu Lys Val Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile
          645          650          655
Ser Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys Leu
          660          665          670
Ile Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val
          675          680          685

```

<210> 5

<211> 227

<212> B1JOK

<213> Homo sapiens

<400> 5

```

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1          5          10          15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20          25          30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35          40          45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50          55          60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65          70          75          80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85          90          95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100          105          110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115          120          125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130          135          140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145          150          155          160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165          170          175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180          185          190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195          200          205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210          215          220
Pro Gly Lys
 225

```