

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 017945

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2013.04.30

(21) Номер заявки
200801197

(22) Дата подачи заявки
2006.10.27

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ СОСТОЯНИЙ
ФИБРОЗА, ВОСПАЛЕНИЯ И НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ ГЛАЗА ЖИВОТНОГО

(31) 11/261,935

(32) 2005.10.28

(33) US

(43) 2009.02.27

(86) PCT/US2006/042027

(87) WO 2007/053447 2007.05.10

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЛПАТ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Саббадини Роджер А., Гарланд
Уильям А., Столлер Гленн Л. (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-B2-6858383

SVETLOV et al. EDG receptors and hepatic
Pathophysiology of LPA and S1P: EDG-ology of Liver
Injury, Biochimica et Biophysica Acta. 2002, vol.
1582, pages 251-256, see entire document

(57) Изобретение относится к композициям и способам предупреждения и лечения заболеваний и патологических состояний глаза животного, отличительной особенностью которых является аберрантный фиброгенез или рубцевание, воспаление и/или аберрантная неоваскуляризация или ангиогенез. В композициях и способах настоящего изобретения применяется моноклональное антитело, которое специфично к сфингозин-1-фосфату (S1P), или его антигенсвязывающий фрагмент.

017945 B1

017945 B1

017945

B1

Родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет следующих патентных документов, приведенных в настоящем описании в качестве ссылки в полном объеме: предварительная патентная заявка США серия № XX/XXXXXXX [номер в реестре патентного поверенного LPT-3010-PV, озаглавленная "Compositions and Methods for Binding Sphingosine-1-Phosphate"], и предварительная патентная заявка США серия № XX/XXXXXXX [номер в реестре патентного поверенного LPT-3020-PV, озаглавленная "Humanized Antibodies to Sphingosine-1-Phosphate in the Treatment of Ocular Disorders"], обе внесены в реестр одновременно с данной заявкой; предварительная патентная заявка США серия № XX/XXXXXXX [номер в реестре патентного поверенного LPT-3100-PV2], внесенная в реестр 12 августа 2006 г., и патентная заявка США № 11/261935, внесенная в реестр 28 октября 2005 г., для которой настоящая заявка представляет собой частичное продолжение.

Область техники

Настоящее изобретение относится к способам лечения глазных болезней при помощи иммунных средств, которые активны против молекул биоактивных липидов, играющих роль сигнальных молекул в заболевании человека и/или животных. Одним из конкретных классов сигнальных биоактивных липидов, рассматриваемых в настоящем изобретении, является класс лизолипидов. Особенно предпочтительными сигнальными лизолипидами являются сфингозин-1-фосфат (S1P) и различные лизофосфатидные кислоты (ЛФК). Антитела против сигнальных липидов, а также их производные и модификации можно использовать для лечения и/или профилактики глазных болезней или нарушений посредством введения фармацевтических композиций, которые содержат такие антитела отдельно или в комбинации с другими терапевтическими средствами и/или способами лечения.

Уровень техники настоящего изобретения

I. Введение.

Следующее описание включает информацию, которая может оказаться полезной для понимания настоящего изобретения. Эту информацию не следует относить к уровню техники настоящего изобретения или к информации, релевантной уровню техники, или любую публикацию, цитируемую прямо или косвенно, считать релевантной заявляемому изобретению.

II. Уровень техники.

Настоящее изобретение относится к способам уменьшения или ослабления aberrантной неоваскуляризации, ангиогенеза, aberrантного фиброгенеза, фиброза и рубцевания, а также воспалительных и иммунных реакций. Указанные процессы по отдельности или вместе вовлечены во многие заболевания и патологические состояния. Эти заболевания или патологические состояния могут быть системными или могут быть относительно локализованными, например протекать на коже или в глазах.

A. Глазные болезни и патологические состояния.

Патологический или aberrантный ангиогенез/неоваскуляризация, aberrантное ремоделирование, фиброз и рубцевание, а также воспаление возникают в связи с ретинальными и глазными ишемическими болезнями, такими как возрастная макулярная дегенерация (ВМД), диабетическая ретинопатия (ДР) и при ретинопатии недоношенных (РН) и других нарушениях развития [Eichler et al. (2006), Curr. Pharm. Des., vol. 12: 2645-60], а также являются результатом инфекций и механических повреждений глаза [Ciulla et al. (2001), Curr. Opin. Ophthalmol., vol. 12: 442-9 и Dart et al. (2003), Eye, vol. 17: 886-92].

Патологический глазной ангиогенез является основной причиной слепоты в различных клинических состояниях. В ряде глазных болезней происходит хориоидальная неоваскуляризация (ХНВ), наиболее распространенной из них является экссудативная, или "влажная", форма ВМД. В результате увеличения числа людей старшего возраста ВМД представляет собой современную эпидемию и основную причину слепоты в западном мире у пациентов старше 60.

Несмотря на эпидемию потери зрения, вызываемой ВМД, только несколько способов лечения, главным образом основанные на анти-VEGF-терапии, могут замедлить развитие ВМД и еще с меньшей вероятностью могут вернуть зрение [Bylsma and Guymer (2005), Clin. Exp. Optom., vol. 88: 322-34, Gryziewszc (2005), Adv. Drug Deliv. Rev., vol. 57: 2092-8 and Liu and Regillo (2004), Curr. Opin. Ophthalmol., vol. 15: 221-6]. Следовательно, поиск новых способов лечения патологической неоваскуляризации является чрезвычайно важным.

ВМД используется здесь только в иллюстративных целях в описании глазных патологических состояний, связанных с aberrантным ангиогенезом/неоваскуляризацией, aberrантным ремоделированием, фиброзом и рубцеванием, а также воспалением, где эти патологические состояния обнаруживаются, и при других глазных болезнях и нарушениях, как описано и заявлено в настоящем описании. ВМД влечет связанные с возрастом патологические изменения [Tezel, Bora and Kaplan (2004), Trends Mol. Med., vol. 10: 417-20 and Zarbin (2004), Arch. Ophthalmol., 122: 598-614]. Существуют многочисленные теории, но точная этиология и патогенез ВМД до сих пор плохо изучены. Старение связано с кумулятивным окислительным повреждением, утолщением оболочки Бруха и образованием друз. Окислительный стресс приводит к повреждению клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и, в некоторых случаях, хориокапилляров [Zarbin (2004), Arch. Ophthalmol., vol. 122: 598-614 и Gorin et al. (1999), Mol. Vis., vol. 5: 29]. Повреждение РПЭ, вероятно, вызывает хроническую воспалительную реакцию в оболочке Бруха и

сосудистой оболочке глаза [Johnson et al. (2000), *Exp. Eye Res.*, vol. 70: 441-9]. Такое повреждение и воспаление благоприятно и делает возможным повреждение сетчатки за счет стимуляции ХНВ и атрофии [Zarbin (2004), *Arch. Ophthalmol.*, vol. 122: 598-614 и Witmer et al. (2003), *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 22: 1-29]. ХНВ приводит к поврежденным и протекающим кровеносным сосудам (КС), что можно определить как рану [Kent and Sheridan (2003), *Mol. Vis.*, vol. 9: 747-55]. Заживление ран начинается с сосудистой оболочки глаза и захватывает субретинальное пространство через оболочку Бруха и РПЭ. Для реакций заживления ран характерны типичная ранняя воспалительная реакция, значительная ангиогенная реакция и образование ткани с последующим окончательным созреванием всех вовлеченных элементов. Ремоделирование раны может необратимо повредить фоторецепторы и РПЭ, таким образом подтверждает необходимость лечения ХНВ не только с помощью антиангиогенных способов лечения [La Cour, Kiilgaard and Nissen (2002), *Drugs Aging*, vol. 19: 101-33,12].

Изменения в нормальном ретинальном и субретинальном строении в результате связанного с ХНВ фиброза, отека и воспаления отдельно или кумулятивно приводят к связанной с ВМД потере зрения [Tezel and Kaplan (2004), *Trends Mol. Med.*, vol. 10: 417-20 и Ambati et al. (2003), *Surv. Ophthalmol.*, vol. 48: 257-93]. Многочисленные клеточные и цитокиновые взаимодействия, которые связаны с экссудативной ВМД, значительно усложняют поиск эффективного способа лечения. В то время как ХНВ и отек частично поддаются воздействию анти-VEGF-терапии, возможные способы лечения, направленного на уменьшение образования рубца и воспаления, не были адекватно изучены [Bylsma and Guymier (2005), *Clin. Exp. Optom.*, vol. 88: 322-34 и Pauleikhoff (2005), *Retina*, vol. 25: 1065-84]. До тех пор пока неоваскулярный комплекс остается нетронутым, как это происходит в случае пациентов, подвергающихся лечению средствами против VEGF, сохраняется возможность субретинального фиброза и потери зрения в будущем.

Анти-VEGF-А-терапия демонстрирует в последнее время значительное продвижение вперед в лечении экссудативной ВМД. Однако стадия III исследования VISION с помощью пегаптаниба, высокоаффинного аптамера, который селективно ингибирует изоформу 165 VEGF-A, показало, что в среднем пациент продолжает терять зрение и лишь у небольшого процента зрение улучшалось [Gragoudas et al. (2004), *N. Engl. J. Med.*, vol. 351: 2805-16]. Ингибирование всех изоформ VEGF-A (общее ингибирование VEGF) фрагментом антитела ранимизумаб приводило к гораздо более впечатляющим результатам [Brown et al. *N. Eng. Med.*, 2006, 355: 1432-44, Rosenfeld et al. *N. Eng. J. Med.* 2006 355: 1419-31]. Двухлетнее исследование MARINA и годовое исследование ANCHOR продемонстрировали, что у приблизительно 40% пациентов достигалось некоторое улучшение зрения. Хотя данные результаты указывают на значительный прогресс в способности лечить экссудативную ВМД, они также демонстрируют, что у 60% пациентов не происходит улучшения зрения. Более того, указанные пациенты должны были отвечать строго определенным критериям включения и исключения. Результаты в большей популяции пациентов могут быть менее робастными.

Существует все еще вполне определенная необходимость в дальнейшей разработке терапевтических средств, направленных на другие стадии развития ХНВ и процессов, которые окончательно приводят к разрушению фоторецепторов. Во-первых, рост хориоидальных КС включает организованное взаимодействие между многими медиаторами, а не только VEGF, что предоставляет возможность для модулирования или ингибирования всего процесса [Gragoudas et al. (2004), *N. Engl. J. Med.*, vol. 351: 2805-16]. Во-вторых, экссудативная ВМД охватывает сосудистый и внесосудистый компоненты. Сосудистый компонент включает эндотелиальные клетки сосудов (ЭК), предшественники ЭК и перициты. Внесосудистый компонент, который по волюмометрическим данным представляет собой наибольший компонент, состоит из клеток воспаления, глии и ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и фибробластов. Повреждение ткани может быть связано с любым из компонентов. Данные другие аспекты патологического процесса современной анти-VEGF-терапией не затрагиваются. Нацеливание на дополнительные элементы ангиогенного каскада, связанного с ВМД, могло бы предоставить более эффективный и синергический подход к терапии [Spaide R.F. (2006), *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 141: 149-156].

1. Воспаление при глазных болезнях.

Появляется все больше доказательств, что воспаление, в особенности макрофаги и система комплемента [Klein et al. (2005), *Science*, vol. 308: 385-9 и Hageman et al. (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 102: 7227-32], играет важную роль в патогенезе экссудативной ВМД. Гистопатология хирургически удаленных хориоидальных неоваскулярных мембран демонстрирует, что макрофаги присутствуют практически везде [Grossniklaus, et al. (1994), *Ophthalmology*, vol. 101: 1099-111 и Grossniklaus et al. (2002), *Mol. Vis.*, vol. 8: 119-26]. Существует все больше доказательств, что макрофаги могут играть активную роль в опосредовании образования и распространения ХНВ [Grossniklaus et al. (2003), *Mol. Vis.*, vol. 8: 119-26; Espinosa-Heidmann, et al. (2003), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 44: 3586-92; Oh et al. (1999), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 40: 1891-8; Cousins et al. (2004), *Arch. Ophthalmol.*, vol. 122: 1013-8; Forrester (2003), *Nat. Med.*, vol. 9: 1350-1 и Tsutsumi et al. (2003), *J. Leukoc. Biol.*, vol. 74: 25-32] путем различных воздействий, включающих секрецию ферментов, которые могут повредить клетки и разрушить оболочку Бруха, а также выброс проангиогенных цитокинов [Otani et al. (1999), *Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 40: 1912-20 и Amin, Puklin and Frank (1994), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 35: 3178-88]. В месте повреждения макро-

фаги проявляют микроморфологические признаки активации, такие как дегрануляция [Oh et al. (1999), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 40: 1891-8 и Trautmann et al. (2000), *J. Pathol.*, vol. 190: 100-6]. Таким образом, можно предположить, что молекула, которая ограничивает инфильтрацию макрофагов в хориоидальный неоваскулярный комплекс, может помочь ограничить образование ХНВ.

2. Хориоидальная неоваскуляризация и созревание кровеносных сосудов при глазных болезнях.

Ангиогенез является существенным компонентом нормального заживления ран, поскольку он доставляет кислород и питательные вещества клеткам воспаления и помогает в удалении дебриса [Lingen (2001), *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 125: 67-71]. Прогрессирующий ангиогенез включает два различных процесса: стадия I: миграция сосудистых ЭК в ответ на расположенные поблизости раздражители к концам капилляров, где они пролиферируют и образуют люминальную структуру; и стадия II: удаление лишних сосудов в сосудистой сети и оптимизация сосудистой системы [Guo et al. (2003), *Am. J. Pathol.*, vol. 162: 1083-93].

Стадия I. Неоваскуляризация. Ангиогенез чаще всего способствует заживлению ран. Однако новые сосуды при отсутствии контроля обычно повреждены и способствуют затеку, кровоизлиянию и воспалению. Уменьшение дисфункциональных и протекающих КС путем воздействия на проангиогенные ФР продемонстрировало определенную способность замедлять развитие ВМД [Pauleikhoff (2005), *Retina*, vol. 25: 1065-84.14 и van Wijngaarden, Coster and Williams (2005), *JAMA*, vol. 293: 1509-13].

Стадия II. Созревание кровеносных сосудов и лекарственная десенсибилизация. Оказывается, что общее ингибирование VEGF оказывает свой благотворный эффект главным образом благодаря уменьшающему просачиваемость воздействию, приводящему к рассасыванию интра- и субретинального отека, поскольку само ХНВ повреждение заметно не уменьшается [Presentation at Angiogenesis, 2006, Meeting, 2006. Bascom Palmer Eye Institute Miami, Florida]. Отсутствие заметного уменьшения ХНВ частично может быть результатом созревания новообразованных сосудов по причине покрытия перицитами. Перициты играют решающую роль в развитии и сохранении ткани сосудов. По-видимому, наличие перицитов придает устойчивость к анти-VEGF-средствам и ослабляет их способность ингибировать ангиогенез [Bergers and Song (2005), *Neuro-oncol*, vol. 7: 452-64; Yamagishi and Imaizumi (2005), *Int. J. Tissue React.*, vol. 27: 125-35; Armulik, Abramsson and Betsholtz (2005), *Circ. Res.*, vol. 97: 512-23; Ishibashi et al. (1995), *Arch. Ophthalmol.*, vol. 113: 227-31]. Средство, которое обладает ингибирующим действием на рекрутинг перицитов, вероятно, будет препятствовать образованию скоплений сосудов и созреванию хориоидальных неоваскулярных сосудов, сохраняя их чувствительность к антиангиогенным средствам.

Ремоделирование сосудистой сети вызывает изменения плотности КС, направленные на удовлетворение потребности в питании [Gariano and Gardner (2005), *Nature*, 438: 960-6]. Периоды незрелости КС соответствуют периоду, в который новые сосуды функционируют, но еще не приобрели слой перицитов [Benjamin, Hemo and Keshet (1998), *Development*, 125: 1591-8 и Gerhardt and Betsholtz (2003), *Cell Tissue Res.*, 2003, 314: 15-23]. Данная задержка существенна для предоставления периода пластичности для точной настройки развивающейся сосудистой системы в соответствии с потребностями ретины или сосудистой оболочки глаза в питании.

Биоактивный липид сфингозин-1-фосфат (S1P), VEGF, PDGF, ангиопэтины (Ang) и другие факторы роста (ФР) увеличивают рост кровеносных сосудов и рекрутируют гладкомышечные клетки (ГМК) и перициты в не подвергавшиеся воздействию сосуды, что способствует ремоделированию возникающих сосудов [Allende and Proia (2002), *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 582: 222-7; Gariano and Gardner (2005), *Nature*, vol. 438: 960-6; Grosskreutz et al. (1999), *Microvasc. Res.*, vol. 58: 128-36; Nishishita, and Lin (2004), *J. Cell. Biochem.*, vol. 91: 584-93 и Erber et al. (2004), *FASEB J.*, vol. 18: 338-40.32]. Перициты, вероятнее всего образуемые при *in situ* дифференциации мезенхимных предшественников во время роста ЭК или миграцией и дедифференциацией артериальных гладкомышечных клеток, непосредственно соединяют и окружают ЭК, что приводит к общему созреванию и долговечности сосудов [Benjamin, Hemo and Keshet (1998), *Development*, vol. 125: 1591-8]. Недавние исследования продемонстрировали, что S1P и рецептор S1P1 вовлечены в перемещение на клеточную поверхность и активацию молекулы межклеточной адгезии N-кадгерина [Paik et al. (2004), *Genes Dev.*, vol. 18: 2392-403]. N-кадгерин играет существенную роль во взаимодействии между ЭК, перицитами и муральными клетками, которые способствуют развитию стабильного сосудистого ложа [Gerhardt and Betsholtz (2003), *Cell Tissue Res.*, vol. 314: 15-23]. Глобальная делеция гена S1P1 приводит к тому, что окружение муральными клетками образующихся КС, необходимое для стабилизации КС во время эмбрионального развития, становится аберрантным [Allende and Proia (2002), *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1582: 222-7]. Локальная инъекция мiPHK к S1P1 подавляет стабилизацию сосудов в моделях с ксенотрансплантами опухоли [Chae et al. (2004), *J. Clin. Invest.*, vol. 114: 1082-9].

Исследования на трансгенных мышах продемонстрировали, что VEGF и PDGF-B способствуют созреванию и стабилизации новых КС [Guo et al. (2003), *Am. J. Pathol.*, 162: 1083-93 и Gariano and Gardner (2005), *Nature*, vol. 438: 960-6.50]. VEGF положительно регулирует Ang-1 (мPHK и белок) [Asahara et al. (1998), *Circ. Res.*, vol. 83: 233-40]. Ang-1 играет основную роль в рекрутинге и сохранении периендотелиальной поддержки перицитами [Asahara et al. (1998), *Circ. Res.*, vol. 83: 233-40]. Внутривидовая инъекция VEGF ускоряла покрытие перицитами сплетения ЭК [Benjamin, Hemo and Keshet (1998), *Development*,

vol. 125: 1591-8]. Мышечные эмбрионы с дефицитом PDGF-B испытывают недостаток в микрососудистых перicyтах, что приводит к отеку, микроаневризмам и летальному кровотечению [Lindahl et al. (1997), *Science*, vol. 277: 242-5]. Предродовые исследования мышей показали, что для полной стимуляции с помощью VEGF и PDGF созревания сосудистого ложа необходимы дополнительные сигналы. На основании отмеченной выше трансактивации S1P, можно предположить, что указанным фактором является S1P [Erber et al. (2004), *FASEB J.*, vol. 18: 338-40]. Стабилизация и созревание сосудов связаны с потерей пластичности и отсутствием регрессии в ответ на удаление VEGF и других ФР и устойчивостью к ангиогенной терапии [Erber et al. (2004), *FASEB J.*, vol. 18: 338-40 и Hughes, and Chan-Ling (2004), *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 45: 2795-806]. Устойчивость КС к ангиогенным ингибиторам обуславливается перicyтами, которые с самого начала стабилизируют созревшие сосуды, и теми, которые рекрутированы к незревшим сосудам при терапии [Erber et al. (2004), *FASEB J.*, vol. 18: 338-40]. После окружения незревших ЭК перicyты экспрессируют компенсирующие факторы живучести (Ang-1 и PDGF-B), которые защищают ЭК от проапоптотических средств.

3. Отек и проницаемость сосудов.

ХНВ мембраны состоят из фенестрированных сосудистых ЭК, которые имеют тенденцию пропускать внутрисосудистое содержимое в окружающее пространство, что приводит к субретинальному кровотечению, экссудатам и аккумуляции жидкости [Gerhardt and Betsholtz (2003), *Cell Tissue Res.*, vol. 14: 15-23]. В течение многих лет предполагали, что ХНВ ткань сама по себе, а позднее, что интратетинальная неоваскуляризация ответственна за уменьшение остроты зрения, связанное с ВМД. Сейчас полагают, однако, что макулярный отек, вызванный повышением проницаемости сосудов (VP) и последующим разрушением гематоретинального барьера (ГРБ), играет главную роль в потере зрения, связанной с ВМД и другими глазными болезнями [Hughes and Chan-Ling (2004), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 45: 2795-806; Felinski and Antonetti (2005), *Curr. Eye Res.*, vol. 30: 949-57; Joussen et al. (2003), *FASEB J.*, vol. 17: 76-8 и Strom et al. (2005), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 46: 3855-8].

4. Фиброз, фиброгенез и образование рубцов.

Образование субретинального фиброза приводит к необратимому поражению фоторецепторов и постоянной потере зрения. До тех пор пока неоваскулярный комплекс остается нетронутым, как это происходит в случае пациентов, получающих лечение средствами против VEGF, сохраняется возможность субретинального фиброза и потери зрения в дальнейшем. В новом варианте PRONTO исследования ранибизумаба было обнаружено, что утрата зрения у пациентов происходит в результате либо субретинального фиброза, либо протекания РПЭ [Presentation at Angiogenesis, 2006, Meeting. 2006. Bascom Palmer Eye Institute Miami, Florida]. Средство, которое смогло бы уменьшить степень инфильтрации фибробластов и отложения коллагена, вероятно, имело бы большое значение.

Фибробласты, особенно миофибробласты, представляют собой ключевые клеточные элементы в образовании рубцов в ответ на клеточное повреждение и воспаление [Tomasek et al. (2002), *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 3: 349-63 и Virag and Murry (2003), *Am. J. Pathol.*, vol. 163: 2433-40]. Экспрессия гена коллагена миофибробластами является отличительным признаком ремоделирования и необходима для образования рубца [Sun and Weber (2000), *Cardiovasc. Res.*, vol. 46: 250-6 и Sun and Weber (1996), *J. Mol. Cell Cardiol.*, vol. 28: 851-8]. S1P способствует заживлению ран путем активации миграции и пролиферации фибробластов при увеличивающемся производстве коллагена [Sun et al. (1994), *J. Biol. Chem.*, vol. 269: 16512-7]. Локально продуцируемый поврежденными клетками S1P может быть причиной неадаптивного заживления ран, связанного с ремоделированием и образованием рубца. Следовательно, можно предположить, что ингибиторы S1P могут быть полезны при заболеваниях или патологических состояниях, характеризующихся, по меньшей мере частично, aberrантным фиброгенезом или фиброзом. При этом "фиброгенез" определяют как избыточную активность или количество фибробластов, а "фиброз" определяют как избыточную активность или количество фибробластов, которые приводят к избыточному или несоответствующему производству коллагена и рубцеванию, разрушению физиологической структуры ткани и/или несоответствующему сокращению матрикса, что приводит к таким патологиям, как отслоение сетчатки, или другим процессам, ведущим к ухудшению функции органа.

В. Другие заболевания или патологические состояния.

Роль биоактивных сигнальных липидов, таких как S1P и ЛФК, не ограничивается глазными болезнями и патологическими состояниями. На основании участия биоллипидной сигнализации во многих процессах, включая неоваскуляризацию, ангиогенез, aberrантный фиброгенез, фиброз и рубцевание, а также воспалительные и иммунные реакции, можно предположить, что ингибиторы таких биоактивных липидов на основе антител могут быть эффективны для множества заболеваний и патологических состояний, связанных с одним или несколькими из указанных процессов. Такие заболевания и патологические состояния могут быть системными (например, системная склеродермия) или локализованными в одной или нескольких определенных частях тела или органах (например, коже, легком или глазах).

С. Биоактивные сигнальные липиды.

В настоящее время понятно, что липиды и их производные представляют собой важные мишени для медицинских исследований, а не только простые структурные элементы клеточных мембран или источник энергии для β -окисления, гликолиза или других метаболических процессов. В частности, некото-

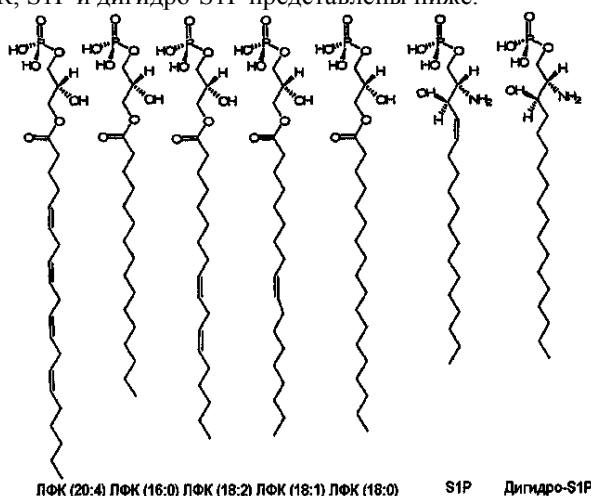
рые биоактивные липиды выполняют функции сигнальных медиаторов, играющих существенную роль в заболеваниях животных и человека. Хотя большинство липидов цитоплазматической мембраны играют исключительно структурную роль, небольшое их количество участвует в передаче внеклеточных импульсов в клетки. "Липидная сигнализация" обозначает любой из множества клеточных путей передачи сигнала, использующих липиды клеточной мембраны в качестве вторичных мессенджеров, а также обозначает прямое взаимодействие липидной сигнальной молекулы со специфическим к ней рецептором. Липидные сигнальные пути активируются множеством внеклеточных импульсов, от факторов роста до воспалительных цитокинов, и регулируют определение судьбы клетки, такой как апоптоз, дифференциация и пролиферация. Изучение сигнализации биоактивных липидов представляет собой область интенсивных научных исследований, поскольку удастся идентифицировать и охарактеризовать действие все большего и большего количества биоактивных липидов.

Примеры биоактивных липидов включают эйкозаноиды (в том числе каннабиноиды, лейкотриены, простагландины, липоксины, эпоксиэйкозатриеновые кислоты и изоэйкозаноиды), неэйкозаноидные каннабиноидные медиаторы, фосфолипиды и их производные, такие как фосфатидная кислота (ФК) и фосфатидилглицерин (ФГ), фактор активации тромбоцитов (ФАТ) и кардиолипины, а также лизофосфолипиды, такие как лизофосфатидилхолин (ЛФХ) и различные лизофосфатидные кислоты (ЛФК). Биоактивные сигнальные липидные медиаторы также включают сфинголипиды, такие как сфингомиелин, церамид, церамид-1-фосфат, сфингозин, сфингозилфосфорилхолин, сфинганин, сфинганин-1-фосфат (дигидро-S1P) и сфингозин-1-фосфат.

Сфинголипиды и их производные представляют собой группу внеклеточных и внутриклеточных сигнальных молекул, оказывающих плеотропное действие на значимые клеточные процессы. Другие примеры биоактивных сигнальных липидов включают фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозитол (ФИ), фосфатидилэтаноламин (ФЭА), диацилглицерид (ДГ), сульфатиды, ганглиозиды и цереброзиды.

Р. Лизолипиды.

Лизофосфолипиды (ЛФЛ), также известные как лизолипиды, представляют собой липиды с низкой молекулярной массой (обычно меньше чем приблизительно 500 Да), которые содержат одну углеводородную цепь и полярную концевую группу, содержащую фосфатную группу. Некоторые лизолипиды являются биоактивными сигнальными липидами. Двумя конкретными примерами важных с точки зрения медицины биоактивных лизолипидов являются ЛФК (глицериновый остов) и S1P (сфингоидный остов). Структуры отдельных ЛФК, S1P и дигидро-S1P представлены ниже.



ЛФК представляет собой не одну молекулярную форму, а набор вариантов эндогенных структур с жирными кислотами различной длины и степени насыщенности (Fujiwara et al (2005), J. Biol. Chem., vol. 280: 35038-35050). Структурный остов ЛФК ведет происхождение от глицериновых фосфолипидов, таких как фосфатидилхолин (ФХ) или фосфатидная кислота (ФК). В случае лизосфинголипидов, таких как S1P, жирная кислота церамидного остова отсутствует. Структурный остов S1P, дигидро-S1P (DHS1P), и сфингозилфосфорилхолина (СФХ) основан на сфингозине, происходящем от сфингомиелина.

ЛФК и S1P регулируют различные клеточные сигнальные пути посредством связывания с тем же самым типом сопряженных с G-белком (GPCR) рецепторов с несколькими трансмембранными доменами (Chun J., Rosen H. (2006), Current. Pharm. Des., vol. 12: 161-171 и Moolenaar W.H. (1999), Experimental Cell Research., vol. 253: 230-238). Рецепторы S1P обозначают S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄ и S1P₅ (ранее EDG-1, EDG-5/AGR16, EDG-3, EDG-6 и EDG-8), а рецепторы ЛФК обозначают LPA₁, LPA₂, LPA₃ (ранее EDG-2, EDG-4 и EDG-7). Для ЛФК был обнаружен четвертый рецептор ЛФК этого семейства (LPA₄), и также сообщалось о других предполагаемых рецепторах для указанных лизофосфолипидов.

Е. Сфингозин-1-фосфат.

S1P является медиатором клеточной пролиферации и защищает от апоптоза за счет активации путей выживания (Maceyka et al. (2002), BBA, vol. 1585: 192-201 и Spiegel S. et al. (2003), Nature Reviews

Molecular. Cell Biology, vol. 4: 397-407). Существует предположение, что баланс между уровнями церамида/сфингозина (CER/SPH) и S1P обеспечивает реостатный механизм, определяющий, пойдет ли клетка по пути смерти или она защищена от апоптоза. Ключевым регулирующим ферментом реостатного механизма является сфингозинкиназа (SPHK), роль которой заключается в преобразовании способствующих смерти биоактивных сигнальных липидов (CER/SPH), что способствует росту S1P. Существует два варианта гибели S1P: S1P может подвергнуться деградации S1P-лиазой, ферментом, который расщепляет S1P до фосфоэтаноламина и гексадеканала, или, реже, гидролизу S1P-фосфатазой до SPH. S1P с избытком производится и хранится в тромбоцитах, которые содержат высокий уровень SPHK и которым недостает ферментов для деградации S1P. Секреция S1P происходит при активации тромбоцитов. Кроме того, полагают, что клетки других типов, например тучные клетки, также способны секретировать S1P. Полагают, что после секреции S1P связывается в высокой концентрации с белками-носителями, такими как сывороточный альбумин и липопротеины. S1P найден в высоких концентрациях в плазме, сообщалось о концентрациях в диапазоне от 0,5 до 5 мкМ. Хотя основным является внеклеточное, также существует предположение о внутриклеточном действии S1P (см., например, Spiegel S., Kolesnick R. (2002), *Leukemia*, vol. 16: 1596-602; Suomalainen, et al. (2005), *Am. J. Pathol.*, vol. 166: 773-81).

Значительная экспрессия S1P рецепторов клеточной поверхности позволяет S1P влиять на широкий спектр клеточных реакций, в том числе пролиферацию, адгезию, сокращение, подвижность, морфогенез, дифференциацию и выживание. Как оказывается, данный спектр реакций зависит от схем экспрессии рецепторов S1P в клеточных и тканевых системах с перекрыванием или обособленно. Кроме того, недавно было продемонстрировано взаимное влияние между сигнальными путями S1P и факторами роста, в том числе тромбоцитарного фактора роста (PDGF), фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), трансформирующего фактора роста бета (TGF β) и основного фактора роста фибробластов (bFGF) (см., например, Baudhuin, et al. (2004), *FASEB J.*, vol. 18: 341-3). Поскольку регуляция различных клеточных процессов, в которые вовлечен S1P, оказывает определенное воздействие, помимо прочего, на нейрональную сигнализацию, тонус сосудов, заживление ран, миграцию иммунных клеток, репродукцию и сердечно-сосудистую функцию, можно предположить, что изменения эндогенного уровня S1P в указанных системах могут оказывать отрицательный эффект, вызывая некоторые патофизиологические состояния, в том числе рак, сердечную недостаточность, глазную болезнь и инфекционные и аутоиммунные заболевания. Авторы предполагают, что потенциально эффективная стратегия лечения ХНБ, связанной с ВМД, заключается в уменьшении биологически доступного внеклеточного уровня S1P. Заявители разработали моноклональное антитело мыши (SPHINGOMAB™, mAb против S1P), которое специфично к S1P. Сфингомаб представляет собой первое успешно полученное моноклональное антитело против биоактивного сигнального сфинголипида-мишени. Сфингомаб действует как молекулярная губка, селективно абсорбируя S1P из внеклеточной жидкости, понижая эффективную концентрацию S1P. Он селективно связывает и нейтрализует S1P с пикомолярной аффинностью в биологических матрицах. Авторы предполагают, что сфингомаб сможет лишить фибробласты, перicyты, а также эндотелиальные, воспалительные и иммунные клетки глаза существенных факторов роста и выживания и, таким образом, будет направлен на несколько неадаптивных стадий ВМД, приводящих к потере фоторецепторов и остроты зрения. Лекарство, которое одновременно воздействует на многие компоненты хориоидальной неоваскулярной реакции, может оказаться более сильным лекарством, чем лекарства "с одной мишенью".

Как применяется в настоящем описании, "сфингозин-1-фосфат", или "S1P", обозначает сфингозин-1-фосфат[сфинген-1-фосфат; D-эритросфингозин-1-фосфат; сфинг-4-енин-1-фосфат; (E,2S,3R)-2-амино-3-гидроксиоктадец-4-енокси]фосфовая кислота; CAS 26993-30-6] и его модификации, S1P и DHS1P (дигидросфингозин-1-фосфат[сфинганин-1-фосфат; [(2S,3R)-2-амино-3-гидроксиоктадексокси]фосфовая кислота; D-эритродигидро-D-сфингозин-1-фосфат; CAS 19794-97-9] и сфингозилфосфорилхолин. "Модификации" S1P и ЛФК, как применяется в настоящем описании, включают аналоги и производные S1P и ЛФК, соответственно которые действуют схожим образом или от которых можно ожидать, что они будут действовать схожим образом, с исходной молекулой.

Растет число доказательств в пользу того, что S1P может вносить вклад как на ранней, так и на поздней стадии неадаптивного ретинального ремоделирования, связанного с экссудативной ВМД. S1P обладает ярко выраженным не зависящим от VEGF проангиогенным действием. S1P также стимулирует миграцию, пролиферацию и выживание многих типов клеток, в том числе фибробластов, ЭК, перicyтов и клеток воспаления - тех же самых клеток, которые принимают участие во многих неадаптивных процессах при экссудативной ВМД. S1P связан с производством и активацией VEGF, bFGF, PDGF и других факторов роста (ФР), вовлеченных в патогенез экссудативной ВМД. Наконец, S1P может модулировать созревание не подвергавшейся воздействию сосудистой системы, процесс, приводящий к потере чувствительности к антиангиогенным средствам. Ингибирование действия S1P может оказаться эффективным терапевтическим воздействием при экссудативной ВМД, что может давать значительные преимущества по сравнению с применением исключительно анти-VEGF подходов или может действовать совместно с ними синергически, чтобы затронуть сложные процессы и различные стадии, которые, в конечном счете, приводят к связанной с ВМД потере зрения.

Растет число доказательств в пользу того, что S1P представляет собой важный медиатор случаев воспаления [Olivera and Rivera (2005), *J. Immunol.*, vol. 174: 1153-8]. Активированные тромбоциты, нейтрофилы, макрофаги и тучные клетки служат богатыми источниками S1P после коагуляции и случаев воспаления [Yatomi et al. (2000) *Blood*, vol. 96: 3431-8]. Поскольку данные клетки являются существенными компонентами при воспалительной реакции и отмирании ткани, S1P может регулировать указанные случаи посредством контролирования воспалительной функции клетки [Tezel (2004), *Trends Mol. Med.*, vol. 10: 417-20]. S1P, выбрасываемый тучными клетками, отвечает за многие из реакций в экспериментальных моделях воспаления на животных [Jolly et al. (2004), *J. Exp. Med.*, vol. 199: 959-70 и Jolly et al. (2005), *Blood*, vol. 105: 4736-42]. Нейтрализация S1P с помощью сфингомаба может предоставить эффективное новое средство ограничения вредной воспалительной реакции, которая усиливает ХНВ повреждение ткани глаза, связанное с ВМД.

Ряд данных позволяют предположить, что S1P и набор рецепторов S1P могут играть главную регулируемую роль в процессе ангиогенеза [Allende and Proia 2002, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1582: 222-7; Spiegel (1993), *J. Lipid Med.*, vol. 8: 169-175 и Argraves et al. (2004), *J. Biol. Chem.*, vol. 279: 50580-90]. В-первых, S1P стимулирует синтез ДНК и хемотаксическую подвижность местных и костно-мозговых сосудистых ЭК в направлении участков васкуляризации во время индуцирования дифференциации мультиклеточных структур при раннем образовании KC [Lee et al. (1999), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 264: 743-325 и Annabi, et al. (2003), *Exp. Hematology*, vol. 31: 640-649]. Во-вторых, S1P стимулирует образование и сохранение скопления сосудистых ЭК и его целостности при помощи активации как S1P₁, так и S1P₃, и индуцируемого S1P адгезионного соединения скопления ЭК [Paik et al. (2004), *Genes Dev.*, vol. 18: 2392-403 и Lee et al. (1999), *Cell*, vol. 99: 301-12]. Антисмысловые олигонуклеотиды против указанных рецепторов S1P уменьшают индуцируемое S1P скопление сосудистых ЭК и целостность клеточного барьера [English, et al. (1999), *J. Hematother. Stem. Cell Res.*, vol. 8: 627-34 и Lee et al. (2001), *Mol. Cell*, vol. 8: 693-704]. В-третьих, было продемонстрировано, что образование капилляров, индуцируемое S1P, представляет собой более мощный проангиогенный импульс, чем bFGF или VEGF [Wang et al. (1999), *J. Biol. Chem.*, vol. 274: 35343-50 и Lee et al. (1999), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 264: 743-325]. Наконец, было показано, что S1P действует совместно с VEGF, EGF, PDGF, bFGF и IL-8, способствуя развитию сосудистых сетей *in vivo* [Wang et al. (1999), *J. Biol. Chem.*, vol. 274: 35343-50]. S1P трансактивирует рецепторы EGF и VEGF2 [Tanimoto, Jin and Berk (2002), *J. Biol. Chem.*, vol. 277: 42997-3001], а VEGF положительно регулирует рецепторы S1P [Igarashi et al. (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 100: 10664-9]. Обработка сосудистых ЭК с помощью VEGF заметно индуцирует увеличение экспрессии S1P1 и увеличивает опосредованные S1P сигнальные пути, что приводит к активации эндотелиальной изоформы синтазы оксида азота (eNOS) [Lee et al. (2001), *Mol. Cell*, vol. 8: 693-704 и Tanimoto, Jin and Berk (2002), *J. Biol. Chem.*, vol. 277: 42997-3001 и Igarashi and Michel (2001), *J. Biol. Chem.*, vol. 276: 36281-8]. Активность eNOS играет решающую роль в различных клеточных реакциях и существенных функциях сосудов, включая ингибирование апоптоза, ингибирование агрегации тромбоцитов и ангиогенез [Kwon et al. (2001), *J. Biol. Chem.*, vol. 276: 10627-33; Huang (2003), *Curr. Hypertens. Rep.*, vol. 5: 473-80; Dantas, Igarashi Michel (2003), *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 284: H2045-52; Rkitake et al. (2002), *Arterioscler. Thromb. Vase Biol.*, vol. 22: 08-114 и Kimura and Esumi (2003), *Acta Biochim. Pol.*, vol. 50: 49-59]. Сосудистые структуры, полученные путем воздействия как bFGF, так и S1P, оказываются более дифференцированными, чем полученные под воздействием только bFGF, что позволяет предположить, что S1P может быть необходим для полной активности bFGF и VEGF [English et al. (2000), *FASEB J.*, vol. 14: 2255-65].

Таким образом, сфингомаб может ослаблять рост aberrантных KC посредством нейтрализации совместно действующих проангиогенных ФР и, возможно, S1P, производимого в избытке во время метаболического стресса клетками воспаления, связанными с ХНВ. Сфингомаб не только ингибирует индуцируемые S1P миграцию/инфильтрацию ЭК и образование KC, но также нейтрализует индуцируемую bFGF и VEGF васкуляризацию посредством своего действия на S1P. Сфингомаб обладает возможным преимуществом по сравнению с лекарствами "с одной мишенью" из-за его способности нейтрализовать S1P, которая приводит к нейтрализации различных ФР посредством плеотропных эффектов S1P.

Прямая нейтрализация S1P и непрямая нейтрализация VEGF и PDGF-B с помощью сфингомаба может предотвратить рекрутинг перидитов, созревание KC и замедлить развитие устойчивости к антиангиогенным препаратам. Нацеливание на перидиты с целью увеличения или усиления чувствительности к антиангиогенным средствам представляет собой привлекательный долгосрочный подход в лечении пациентов с активными ХНВ повреждениями и может способствовать инволюции сосудистых комплексов [Erber et al. (2004), *FASEB J.*, vol. 18: 338-40].

S1P способствует организации актина в кортикальные кольца и усиливает адгезию как внутриклеточную, так и с клеточным матриксом [McVerry and Garcia (2005), *Cell Signal*, vol. 17: 131-9 и McVerry and Garcia (2004), *J. Cell Biochem.*, vol. 92: 1075-85]. Указанные изменения структуры коррелируют с уменьшенной проницаемостью сосудов [Hla (2004), *Semin Cell Dev. Biol.*, vol. 15: 513-20]. Было показано, что блокирование функции S1P увеличивает проницаемость сосудов в почках, легочном круге кровообращения и опухолях [LaMontagne et al. (2006), *Cancer Res.*, vol. 66: 221-31; Sanchez et al. (2003), *J. Biol.*

Chem., vol. 278: 47281-90 и Awad et al. (2006), Am. J. Physiol. Renal. Physiol., vol. 290: F1516-24]. Малоизвестно, однако, о воздействии S1P на проницаемость в различных органах, таких как мозг и глаз. ЭК сосудов мозга и, вероятно, глаза образуют более плотные, менее проницаемые барьеры для жидкости и растворенных веществ, чем ЭК легочной артерии [Schnitzer et al. (1994), Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 199: 11-19] и, наиболее вероятно, чем также почек и опухолей. Неодинаковые барьерные функции объясняют значительно большим количеством комплексов фокальной адгезии [Schnitzer et al. (1994), Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 199: 11-19]. В свете указанных различий индуцируемые S1P изменения в проницаемости глазных сосудов могут быть менее существенными.

VEGF и PDGF могут нарушить целостность гематоретинального барьера (ГРБ): способность сфингомаб нейтрализовать трансактивацию VEGF и PDGF с помощью S1P может оказаться эффективной в ослаблении макулярного отека, связанного с БМД [Sanchez et al. (2003), J. Biol. Chem., vol. 278: 47281-90; Saishin et al. (2003), J. Cell. Physiol. vol. 195: 241-8 и Viores et al. (2000), Gen Pharmacol., vol. 35: 233-9]. Трансгенные мыши, сверхэкспрессирующие VEGF, демонстрируют разрушение ГРБ в области ХНВ, аналогичное наблюдаемому при БМД и диабетических ретинопатиях [Viores et al. (2000), Adv. Exp. Med. Biol., vol. 476: 129-38]. Ингибиторы киназы рецептора PDGF уменьшают просачивание, вызванное индуцируемым простагландинами разрушением ГРБ [Lindahl et al. (1997), Science, vol. 277: 242-5]. Наконец, сфингомаб ослабляет действие bFGF и VEGF in vivo, как было проверено в модели на мышах с имплантантом матригеля, как описано в примерах данной заявки.

S1P и пролиферация фибробластов и защита от клеточной гибели: фибробласты реагируют на обработку S1P увеличением синтеза ДНК; фибробласты, трансфицированные сфингозинкиназой 1 (sphK1), демонстрируют увеличение клеточной пролиферации [Hammer et al. (2004), J. Cell Biochem., vol. 91: 840-51]. Таким же образом, как S1P действует на некоторые другие типы фибробластов (Swiss 3T3, легочные и кардиальные), S1P может стимулировать пролиферацию (и последующую дифференциацию) глазных фибробластов. Добавление S1P непосредственно защищает фибробласты от апоптоза, а ингибиторы sphK1 увеличивают апоптоз [Olivera et al. (1999), J. Cell Biol., vol. 147: 545-58]. S1P блокирует выброс цитохрома C и последующую активацию каспазы [Olivera et al. (1999), J. Cell Biol., vol. 147: 545-58 и Kang et al. (2004), Cell Death. Differ., vol. 11: 1287-98]. Установлено, что sphK1 положительно регулирует Akt, посредством этого регулируя членов семейства Bcl-2 [Limaye et al. (2005), Blood, vol. 105: 3169-77] и защищая фибробласты от апоптоза.

S1P и миграция фибробластов: S1P активирует сигнальные системы, включая Rho, что приводит к скоплению сократительных актиновых нитей, контролируемых системой Rho/Rac/Cdc42, и ведет к значительному воздействию на клеточную миграцию [Radeff-Huang et al. (2004), J. Cell Biochem., vol. 92: 949-66]. Активация Rho и Rho ГТФаз с помощью S1P может отвечать за миграцию глазных фибробластов в рану и таким образом вносить свой вклад в фиброз.

S1P и экспрессия коллагена фибробластами: S1P способствует дифференциации покоящихся фибробластов в активные миофибробласты, которые демонстрируют увеличенную экспрессию коллагена во время образования рубца [Urata et al. (2005), Kobe J. Med. Sci., vol. 51: 17-27]. Одновременно с пролиферацией и миграцией фибробластов в зону рубцевания миофибробласты формируют временную гранулярную сеть, содержащую, в первую очередь, остеопонтин и фибронектин [Sun and Weber (2000), Cardiovasc. Res., vol. 46: 250-6]. Когда происходит ремоделирование, временный матрикс абсорбируется и устанавливается коллагеновая сеть [Sun and Weber (2000), Cardiovasc. Res., vol. 46: 250-6]. Авторы продемонстрировали, что S1P способствует производству коллагена миофибробластами. Показано, что TGF β , хорошо известный медиатор фиброза, усиливает несколько профибротических белков, превращает фибробласты в миофибробласты и стимулирует экспрессию воспалительного белка, возможно, посредством действия S1P [Squires et al. (2005), J. Mol. Cell Cardiol., vol. 39: 699-707 и Butt, Laurent and Bishop (1995), Eur. J. Cell Biol., vol. 68: 330-5]. Активацию TIMP1, сигнальной молекулы, вовлеченной в стимулируемую TGF β дифференциацию фибробластов в миофибробласты, блокирует миРНК против sphK1 [Yamanaka et al. J. Biol. Chem. 2004 Dec. 24; 279(52): 53994-4001], что позволяет предположить, что сфингомаб может ослаблять профибротическое действие TGF β , также ослабляя фиброгенное действие самого S1P. Минимизация неадаптивного образования рубца путем нейтрализации S1P может оказаться полезной и предотвратить необратимые потери остроты зрения путем ограничения объема субретинального фиброза и последующего повреждения фоторецепторов.

Ф. Лизофосфатидные кислоты (ЛФК).

ЛФК давно были известны в качестве предшественников в биосинтезе фосфолипидов как в эукариотических, так и в прокариотических клетках, но недавно оказалось, что ЛФК являются сигнальными молекулами, которые быстро продуцируются и выбрасываются активированными клетками, особенно тромбоцитами, для того, чтобы воздействовать на клетки-мишени посредством действия на специфические рецепторы клеточной поверхности (см., например, Moolenaar et al. (2004), BioEssays, vol. 26: 870-881 и van Leewen et al. (2003), Biochem. Soc. Trans, vol. 31: 1209-1212). Помимо того, что они синтезируются и превращаются в более сложные фосфолипиды в эндоплазматическом ретикулуме, ЛФК могут быть получены посредством гидролиза имеющихся фосфолипидов вслед за активацией клеток; например, в положении sn-2 остаток жирной кислоты часто отсутствует из-за деацилирования, и только sn-3 гидро-

ксил остается этерифицирован жирной кислотой. Более того, ключевой фермент в производстве ЛФК, аутоаксин (lysoPLD/NPP2), может быть продуктом онкогена, поскольку многие типы опухолей активируют аутоаксин (Brindley (2004), *J. Cell Biochem.*, vol. 92: 900-12). Сообщалось о концентрациях ЛФК в плазме и сыворотке человека, включая измерения, сделанные с помощью чувствительных и специфических методов ЖХ/МС (Baker et al. (2001), *Anal. Biochem.*, vol. 292: 287-295). Например, в свежей сыворотке человека, выдержанной при 25°C в течение 1 ч, были измерены концентрации ЛФК приблизительно 1,2 мкМ, при этом основными составляющими оказались аналоги ЛФК 16:0, 18:1, 18:2 и 20:4. Аналогично, в свежей плазме человека, выдержанной при 25°C в течение 1 ч, были измерены концентрации ЛФК приблизительно 0,7 мкМ, при этом основными составляющими оказались аналоги ЛФК 18:1 и 18:2.

ЛФК влияет на большое число биологических реакций, включая индуцирование пролиферации клеток, стимуляцию миграции клеток и ретракции нейритов, прекращение щелевого соединения и даже хемотаксис миксомицетов (Goetzl et al. (2002), *Scientific World Journal*, vol. 2: 324-338). Количество знаний о биологии ЛФК продолжает расти, поскольку все больше и больше клеточных систем тестируют на способность к реакции на ЛФК. Например, в настоящее время известно, что, помимо стимуляции роста и пролиферации клеток, ЛФК способствует клеточному напряжению и связыванию фибронектина на клеточной поверхности, что является важным моментом в заживлении и регенерации ран (Moolenaar et al. (2004), *BioEssays*, vol. 26: 870-881). Недавно была описана антиапоптотическая активность ЛФК, и было недавно сообщено, что гамма-рецептор пролиферации пероксисом является рецептором/мишенью для ЛФК (Simon et al. (2005), *J. Biol. Chem.*, vol. 280: 14656-14662).

Недавно заявители разработали несколько моноклональных антител против ЛФК. Как и антитело против S1P, антитела против ЛФК могут нейтрализовать различные ЛФК и ослаблять их биологическое и фармакологическое действие. Ожидается, что для применения при глазной болезни и патологических состояниях антитела против ЛФК будут влиять, давая положительный эффект, на следующие процессы.

ХНВ и созревание КС: аутоаксин, секретируемая лизофосфолипаза D, отвечающая за производство ЛФК, является существенным для образования кровеносных сосудов во время развития [van Meeteren et al. (2006), *Mol. Cell Biol.*, vol. 26: 5015-22]. Кроме того, определено, что ненасыщенные ЛФК вносят большой вклад в индуцирование дифференциации гладкомышечных клеток сосудов [Hayashi et al. (2001), *Circ. Res.*, vol. 89: 251-8].

Отек и проницаемость сосудов: ЛФК индуцирует экссудацию плазмы и выброс гистамина у мышей [Hashimoto et al. (2006), *J. Pharmacol. Sci.*, vol. 100: 82-7].

Воспаление: ЛФК действует в качестве медиатора воспаления в роговичных эпителиальных клетках человека [Zhang et al. (2006), *Am. J. Physiol.*, June 7]. ЛФК принимает участие в заживлении ран роговицы [Lilium K. et al. (1998), *Am. J. Physiol.*, vol. 274: C1065-C1074] и стимулирует выброс ROS в ткани хрусталика [Rao et al. (2004), *Molecular Visions*, vol. 10: 112-121]. ЛФК также может реактивировать HSV-1 в роговой оболочке глаза кролика [Martin et al. (1999), *Molecular Visions*, vol. 5: 36-42].

Образование фиброза и рубцов: ЛФК ингибирует опосредованную TGFβ стимуляцию стабильности мРНК коллагена I типа через ERK-путь в фибробластах кожи [Sato et al. (2004), *Matrix Biol.*, vol. 23: 353-61]. Более того, ЛФК оказывают определенное прямое фиброгенное действие посредством стимулирования экспрессии гена коллагена и пролиферации фибробластов [Chen, et al. (2006) *FEBS Lett.* 580(19): 4737-45].

3. Определения.

До того как рассматриваемое изобретение будет описано подробно, будут даны определения некоторым терминам, используемым в контексте настоящего изобретения. В дополнение к данным терминам другие определяются в разных местах спецификации при необходимости. Если иное не определено явно в настоящем описании, термины из данной области техники, используемые в настоящей спецификации, имеют значения, принятые в данной области техники.

"Иммунное средство" обозначает любое поликлональное или моноклональное антитело или фрагмент антитела, модификацию или производное.

"Антитело против S1P", или "иммунное средство, реагирующее против S1P", обозначает любое антитело или родственную антителу молекулу, которая связывается с S1P.

"Антитело против ЛФК", или "иммунное средство, реагирующее против ЛФК", обозначает любое антитело или родственную антителу молекулу, которая связывается со всеми, или одной, или несколькими из ЛФК.

"Биоактивный липид" обозначает липидную сигнальную молекулу. Как правило, биоактивный липид не находится в биологической мембране, когда он осуществляет свое сигнальное действие, что означает, что если такая липидная молекула может каким-то образом находиться в биологической мембране (например, мембране клетки, мембране клеточной органеллы и т.д.), то когда она связана с биологической мембраной, она не является "биоактивным липидом", но вместо этого представляет собой молекулу "структурного липида". Биоактивные липиды отличаются от структурных липидов (например, фосфолипидов мембраны) тем, что они опосредуют внеклеточную и/или внутриклеточную сигнализацию и таким образом вовлечены в контролирование функционирования многих типов клеток посредством модулиро-

вания дифференциации, миграции, пролиферации, секреции, выживания и других процессов. *In vivo* биоактивные липиды могут быть найдены во внеклеточных жидкостях, где они могут образовывать комплексы с другими молекулами, например сывороточными белками, такими как альбумин и липопротеины, или существовать в "свободной" форме, т.е. не образуя комплексов с другими типами молекул. В качестве внеклеточных медиаторов некоторые биоактивные липиды изменяют клеточную сигнализацию посредством активации мембранных ионных каналов или рецепторов, сопряженных с G-белком, что, в свою очередь, активирует сложные сигнальные системы, что приводит к изменениям в функционировании или выживании клетки. В качестве внутриклеточных медиаторов биоактивные липиды могут оказывать свое действие путем прямого взаимодействия с внутриклеточными компонентами, такими как ферменты и ионные каналы. Типичные примеры биоактивных липидов включают ЛФК и S1P.

Термин "терапевтическое средство" обозначает средство для ослабления ангиогенеза и/или неоваскуляризации, например ХНВ и созревания КС; отека, проницаемости сосудов и фиброза, фиброгенеза и рубцевания, связанных или являющихся частью основной патологии глазных болезней и патологических состояний.

Термин "комбинированное лечение" обозначает схему лечения, которая включает применение по меньшей мере двух различных способов лечения для достижения указанного терапевтического эффекта. Например, комбинированная терапия может включать введение двух или более химически различных активных ингредиентов, например антитела против ЛФК и антитела против S1P. Альтернативно, комбинированная терапия может включать введение иммунного средства, реагирующего против биоактивного липида, и введение одного или нескольких других химиотерапевтических средств. В другом случае комбинированная терапия может включать введение антитела против липида совместно с применением другого способа лечения, такого как лучевая терапия и/или оперативное вмешательство. Кроме того, комбинированная терапия может включать введение антитела против липида совместно с одним или несколькими другими биологическими средствами (например, средством против VEGF, TGF β , PDGF или bFGF), химиотерапевтическими средствами и другими способами лечения, такими как лучевая терапия и/или оперативное вмешательство. В контексте комбинированной терапии с помощью двух или более химически различных активных ингредиентов понятно, что активные ингредиенты можно вводить как части одной и той же композиции или как различные композиции. При введении в виде отдельных композиций композиции, содержащие различные активные ингредиенты, можно вводить в одно и то же время или в разное время, одним и тем же или различными способами, применяя одну и ту же или различные схемы дозировки, все в зависимости от требований конкретного контекста и как определено лечащим врачом. Аналогично, когда одно или несколько антител против липидов, например антител против ЛФК, отдельно или в соединении с одним или несколькими химиотерапевтическими средствами, комбинируют, например, с лучевой терапией и/или оперативным вмешательством, препарат(ы) может быть введен до или после оперативного вмешательства или лучевого лечения.

"Монотерапия" обозначает схему лечения, основанную на применении терапевтически эффективного вещества, которое вводят в виде одной дозы или нескольких доз в течение времени.

"Патентоспособная" композиция, способ, механизм или изделие в соответствии с настоящим изобретением обозначают, что указанный объект удовлетворяет всем установленным законом требованиям патентоспособности на время проведения анализа. Например, что касается новизны, неочевидности или тому подобного, то если позднейшее исследование покажет, что один или несколько из пунктов формулы изобретения охватывают один или несколько вариантов осуществления, которые отвергают новизну, неочевидность и т.д., то пункт(ы) формулы изобретения, ограниченный определением "патентоспособного" варианта осуществления, прямо исключает непатентоспособный вариант(ы) осуществления. Кроме того, прилагаемая к описанию формула изобретения должна пониматься как таким образом, чтобы предоставить наиболее широкий приемлемый объем притязаний, так и таким образом, чтобы сохранить ее действительность. Более того, формула изобретения должна пониматься таким образом, при котором (1) сохраняется ее действительность и (2) предоставляется наиболее широкое приемлемое понимание при условиях, когда в одно или несколько из предусмотренных законом требований для патентоспособности будут внесены поправки или когда со времени внесения данной заявки в реестр или выдачи ее в качестве патента до времени, когда действительность одного или нескольких пунктов прилагаемой формулы изобретения будет подвергнута сомнению, произойдут изменения стандартов определения, удовлетворено ли конкретное предусмотренное законом требование.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" обозначает соли, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства средств и веществ настоящего изобретения и которые не являются биологически или как-либо еще нежелательными. Во многих случаях средства и вещества настоящего изобретения способны к образованию кислых и/или основных солей по причине наличия заряженных групп, например заряженных амино- и/или карбоксильных групп или аналогичных групп. Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты можно получить из неорганических и органических кислот, тогда как фармацевтически приемлемые соли присоединения основания можно получить из неорганических и органических оснований. Для обзора по фармацевтически приемлемым солям см. Berge, et al. (1977) *J. Pharm. Sci.*, vol. 66, 1-19.

Термины "разделены", "очищены", "выделены" и тому подобные обозначают, что один или несколько из компонентов образца, содержащегося в сосуде с образцом, физически отделяют или отделили от одного или нескольких других компонентов образца, находящихся в сосуде, или разбавляют или разбавили в присутствии одного или нескольких других компонентов образца, находящихся в сосуде. Компоненты образца, которые могут быть отделены или разбавлены во время стадии разделения или очистки, включают продукты химической реакции, непрореагировавшие реагенты, белки, углеводороды, липиды и свободные молекулы.

Термин "вещество" используется в настоящем описании в различном контексте, например определенное вещество в составе химиотерапевтического средства. В каждом контексте термин обозначает совокупность химически неотделимых друг от друга молекул соответствующего конкретному контексту типа.

"Специфически связанный" и "специфическая связь" и тому подобное обозначают специфическое, неслучайное взаимодействие между двумя молекулами, которое зависит от наличия структурных, гидрофобных/гидрофильных и/или электростатических особенностей, которые делают возможными соответствующие химические или молекулярные взаимодействия между указанными молекулами.

В настоящем описании "стабильное" обозначает взаимодействие между двумя молекулами (например, связывание антитела против ЛФК или против S1P с биоактивным липидом-мишенью), которое достаточно сильно, так что молекулы могут быть удержаны для желаемой цели или манипуляции.

"Субъект" или "пациент" обозначает животное, на лечение которого могут повлиять молекулы настоящего изобретения. У животного может быть заболевание или патологическое состояние, которое можно лечить при помощи композиций и/или способов настоящего изобретения, или он может находиться под его угрозой, или могут предполагать, что у животного оно есть, или оно находится под его угрозой. Животные, которых можно лечить в соответствии с настоящим изобретением, включают позвоночных, в том числе млекопитающих, таких как коровы, собаки, лошади, кошки, овцы, свиньи и приматы (включая людей и других приматов), которые являются особенно предпочтительными примерами.

"Терапевтически эффективное количество" (или "эффективное количество") обозначает количество активного ингредиента, например средства в соответствии с настоящим изобретением, достаточное для эффективного лечения, когда оно применяется к субъекту или пациенту. Соответственно, каким является терапевтически эффективное количество композиции в соответствии с настоящим изобретением, без труда может определить средний специалист в данной области техники. В контексте глазной терапии "терапевтически эффективное количество" представляет собой количество, производящее объективно измеряемое изменение одного или нескольких параметров, связанных с лечением глазной болезни или патологического состояния, включая повышение или понижение экспрессии одного или нескольких генов, связанных с глазной болезнью или патологическим состоянием, индуцирование апоптоза или иных путей гибели клетки, клиническое улучшение симптомов, уменьшение aberrантной неоваскуляризации или воспаления и т.д. Конечно, терапевтически эффективное количество будет изменяться в зависимости от конкретного субъекта и состояния, подвергаемого лечению, веса и возраста субъекта, тяжести заболевания, конкретного выбранного вещества, схемы дозирования, которой следуют, продолжительности введения, способа введения и тому подобного, все это без труда может определить средний специалист в данной области техники. Следует понимать, что в контексте комбинированной терапии определение терапевтически эффективного количества конкретного активного ингредиента может отличаться от определения терапевтически эффективного количества активного ингредиента, когда он вводится при монотерапии (т.е. терапевтической схеме, в которой применяют только одно химическое соединение в качестве активного ингредиента).

Термин "терапия" или "лечение" заболевания или нарушения включает профилактику или защиту от заболевания или нарушения (а именно предотвращение развития клинических симптомов); ингибирование заболевания или нарушения (т.е. остановку или подавление развития клинических симптомов); и/или облегчение заболевания или нарушения (т.е. вызывание ослабления клинических симптомов). Как можно понять, не всегда существует возможность различить "профилактику" и "подавление" заболевания или нарушения, поскольку первичное индуцирующее событие или события может быть неизвестным или латентным. Соответственно термин "профилактика" следует понимать как вид "лечения", который охватывает как "профилактику", так и "подавление". Таким образом, термин "лечение" включает "профилактику".

Термин "схема лечения" обозначает любое лечение заболевания или нарушения с применением химиотерапевтических препаратов, лучевой терапии, оперативного вмешательства, генной терапии, ДНК-вакцин и терапии, антисмысловой терапии, включая миРНК-терапию, антиангиогенной терапии, иммунотерапии, трансплантатов костного мозга, аптамеров и других биопрепаратов, таких как антитела и модификации антител, рецепторы-ловушки и другие белковые лекарства.

Сущность изобретения

В соответствии с настоящим изобретением предоставляются способы лечения глазных болезней или патологических состояний посредством введения фармацевтической композиции, содержащей иммунное средство (например, антитело), вступающее в реакцию против биоактивного липида, для того

чтобы понизить эффективную концентрацию, так что происходит целиком или частично ингибирование нежелательного действия биоактивного липида. В некоторых вариантах осуществления иммунное средство представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, модификацию или производное. В некоторых вариантах осуществления иммунное средство реагирует против лизолипида, такого как S1P или ЛФК. Также предлагаются способы уменьшения или профилактики aberrантного фиброгенеза, фиброза или рубцевания; воспаления или aberrантной неоваскуляризации; модулирования реакций заживления хирургических и травматических ран глаза или ослабления глазной иммунной реакции. Кроме того, предлагаются способы уменьшения эффективной концентрации в глазах или активности биоактивного липида. Также предлагаются способы лечения склеродермии с помощью иммунного средства, реагирующего против биоактивного липида, такого как лизолипиды S1P или ЛФК. Типичные биоактивные липиды включают сфинголипиды и их модификации, такие как сфингозин-1-фосфат (S1P), сфингозин, сфингозилфосфорилхолин, дигидросфингозин. Другие биоактивные лизолипиды включают лизофосфатидные кислоты (ЛФК) и их модификации.

Другой аспект настоящего изобретения касается фармацевтических или ветеринарных композиций, включая композиции для глазного введения, которые включают носитель и отдельное иммунное средство, например моноклональное антитело или фрагмент, модификацию, или производное антитела, реагирующего против биоактивного липида. Предпочтительные носители включают носители, которые являются фармацевтически приемлемыми, особенно, когда композицию намереваются применять людям в лечебных целях. Для лечебных применений не к людям (например, в лечении домашних животных, скота, рыб или птиц) можно применять ветеринарно приемлемые носители.

Примеры способов применения иммунного средства в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно в качестве составляющей терапевтической композиции включают системное введение, парентеральное введение (например, посредством внутривенной, внутримышечной или подкожной инъекции), трансдермальное, интрадермальное или трансмукозальное введение, внутриглазную или окологлазную инъекцию, мукозальное или местное применение или ингаляцию.

Эти и другие аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения рассмотрены более подробно в следующих далее разделах.

Краткое описание чертежей

Настоящая патентная заявка содержит по меньшей мере один чертеж, выполненный в цвете. Копии настоящей патентной заявки с цветным чертежом(ами) будут предоставлены по запросу и необходимой оплате.

Фиг. 1 - сфингомаб уменьшает ХНВ и образование рубца при глазных повреждениях. Мыши были обработаны сфингомабом или неспецифическим mAb с совпадающим изотипом. ХНВ повреждения вызывали, разрывая лазером оболочку Бруха. Показаны графики и типичные изображения повреждений в каждой из обработанных групп, окрашенные конъюгированным с родамином агглютинином I R. communitis для наблюдения васкуляризации (A) или трихромом по Массону для наблюдения образования коллагенового рубца (B). Фиг. 1a показывает, что сфингомаб значительно снижает хориоидальную неоваскуляризацию через 14 и 28 дней после индуцированного лазером разрыва оболочки Бруха. Фиг. 1b показывает, что сфингомаб значительно уменьшает фиброз, связанный с образованием ХНВ повреждения, через 28 дней после индуцированного лазером разрыва оболочки Бруха.

Фиг. 2 - S1P способствует неоваскуляризации посредством индуцирования образования сосудов и миграции HUVEC, и его эффект уменьшается под воздействием сфингомаба. Панель A: микроснимки HUVEC, посеянных на матрикеле и инкубированных в течение 6 ч, для того чтобы определить образование сосудов. Панель B: HUVEC обрабатывали 1 мкМ S1P ± сфингомаб (1 мкг/мл) в течение 6 ч в инвазионной камере с матрикелем. Количество клеток, которые мигрировали в матричелевую мембрану, подсчитывали на 5 независимых полях.

Фиг. 3 - сфингомаб нейтрализует индуцируемую S1P, VEGF и bFGF неоваскуляризацию. A: типичные КС, окрашенные FITC, из срезов имплантатов матригеля ± ФР. B: S1P стимулирует инфильтрацию ЭК. C: количественный анализ относительной флуоресценции имплантатов матригеля, стимулированных VEGF или bFGF, в качестве индикатора неоваскуляризации. Действие S1P, VEGF и bFGF было ингибировано, когда мышей системно подвергали воздействию 1 или 25 мг/кг сфингомаба.

Фиг. 4 - сфингомаб нейтрализовывал стимулируемое S1P образование рубца. Фибробласты были лишены сыворотки и затем обработаны 0, 0,1, 0,5 или 1 мкМ S1P ± 1 мкг/мл сфингомаба в течение 12-24 ч. S1P стимулировал пролиферацию фибробластов Swiss 3T3, измеренную при помощи внедрения ³H-тимидина (A), миграцию мышинных кардиальных фибробластов в анализе заживления шрамов (B), экспрессию гена коллагена (относительная флуоресценция) в кардиальных фибробластах, выделенных из трансгенных мышей, экспрессирующих коллаген-GFP (C), и дифференциацию клеток WI-38 в миофибробласты, измеренную по уменьшению клеточной пролиферации и увеличению экспрессии α-ГМА (D); сфингомаб нейтрализовывал каждый из эффектов S1P; сфингомаб уменьшал периваскулярный фиброз in vivo в модели необратимого инфаркта миокарда на мышях (E).

Фиг. 5 - S1P способствует трансформации глазных эпителиальных клеток и фибробластов в сокра-

сжимающие миофибробласты, продуцирующие рубцовую ткань. Было исследовано воздействие S1P на трансформацию миофибробластов нескольких линий клеток глаза человека. Было обнаружено, что S1P стимулирует производство α -гладкомышечного актина (α -ГМА; маркер миофибробластов) в клетках ретиального пигментного эпителия человека (фиг. 5A) и фибробластах конъюнктивы человека (фиг. 5B). Указанные данные демонстрируют впервые, что S1P входит в число факторов, которые способствуют трансформации глазных эпителиальных клеток и фибробластов в сократительные, продуцирующие рубцовую ткань миофибробласты. Также было исследовано воздействие S1P на экспрессию ингибитора активатора плазминогена (ИАП-1) в фибробластах конъюнктивы человека. Увеличивающаяся экспрессия ИАП-1 находится в связи с уменьшением протеолитической деградации соединительной ткани и активируется в связи с несколькими фиброзными заболеваниями, которые влекут за собой увеличенное рубцевание. Как показано на фиг. 5C, S1P стимулирует экспрессию ИАП-1 зависимым от дозировки образом.

Фиг. 6 - сфингомаб уменьшает инфильтрацию раны иммунными клетками *in vivo*. Мышей подвергали MI (ИМ), через 48 ч после операции подвергали воздействию солевого раствора или 25 мг/кг сфингомаба и затем забивали на 4 день. Сфингомаб уменьшает инфильтрацию в рану макрофагов (A) и тучных клеток (B). Данные показывают, во сколько раз произошло уменьшение по сравнению с величинами, полученными в случае воздействия солевого раствора.

Фиг. 7 - сфингомаб высокоспецифичен к S1P. График на основании конкурентного ELISA показывает специфичность сфингомаба к S1P по сравнению с другими биоактивными липидами. Сфингомаб не демонстрирует перекрестной реактивности со сфингозином (SPH), непосредственным метаболическим предшественником S1P, или лизофосфатидной кислотой (ЛФК), важной молекулой внеклеточной сигнализации, которая структурно и функционально похожа на S1P. Сфингомаб не распознает другие похожие структурно липиды и метаболиты, включая церамид-1-фосфат (C1P), дигидросфингозин (DH-SPH), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилэтаноламин (ФЭ) или сфингомиелин (СМ). Сфингомаб перекрестно реагирует с дигидросфингозин-1-фосфатом (DH-S1P) и в меньшей степени сфингозилфосфорилхолином (SPC). Аффинность (K_d) сфингомаба к S1P составляет <100 пМ, гораздо больше, чем у большинства терапевтических антител, в частности у других молекулярных губок.

Подробное описание изобретения

1. Вещества.

Термин "иммунное средство", который включает антитела (Ab) или иммуноглобулины (Ig), обозначает любую форму пептида, полипептида, происходящего от, созданного по шаблону или кодируемого посредством гена иммуноглобулина, или фрагмент такого пептида или полипептида, который способен связывать антиген или эпитоп [см., например, Immunobiology, 5th Edition, Janeway, Travers, Walport, Shlomchik (editors), Garland Publishing (2001)]. В настоящем изобретении антиген представляет собой молекулу биоактивного липида. Молекулы антител или иммуноглобулины представляют собой большие молекулы гликопротеинов с молекулярным весом приблизительно 150 кДа, обычно состоящие из двух различных типов полипептидной цепи. Одна полипептидная цепь, называемая "тяжелой" цепью (H), составляет приблизительно 50 кДа. Другой полипептид, называемый "легкой" цепью (L), составляет приблизительно 25 кДа. Каждая молекула иммуноглобулина обычно состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей. Две тяжелые цепи связаны друг с другом дисульфидными связями, количество которых варьируется между тяжелыми цепями различных изотипов иммуноглобулинов. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью. В любой природной молекуле антитела две тяжелые цепи и две легкие цепи идентичны, образуя два идентичных антигенсвязывающих участка, и поэтому они называются бивалентными, т.е. обладающими способностью связываться одновременно с двумя идентичными молекулами.

"Легкие" цепи молекул антител любого вида позвоночных могут быть отнесены к одному из двух отчетливо различающихся типов, каппа (κ) и лямбда (λ), исходя из аминокислотных последовательностей их константных доменов. Соотношение между двумя типами легкой цепи варьируется от вида к виду. В качестве примера среднее отношение $\kappa:\lambda$ составляет у мышей 20:1, тогда как у людей оно составляет 2:1, а у кошек 1:20.

"Тяжелые" цепи молекул антител любого вида позвоночных могут быть отнесены к одному из пяти отчетливо различающихся типов, называемых изотипами, исходя из аминокислотных последовательностей их константных доменов. Некоторые изотипы включают несколько подтипов. Пятью основными классами иммуноглобулинов являются иммуноглобулин M (IgM), иммуноглобулин D (IgD), иммуноглобулин G (IgG), иммуноглобулин A (IgA) и иммуноглобулин E (IgE). IgG представляет собой наиболее распространенный изотип и включает несколько подклассов (IgG1, 2, 3 и 4 у людей). Fc-фрагмент и шарнирные участки различаются в антителах различных изотипов, чем определяются их функциональные свойства. Однако общая структура доменов схожа во всех изотипах.

Термин "вариабельный домен" обозначает N-концевую часть молекулы антитела или ее фрагмент. Как правило, в каждой из четырех цепей присутствует вариабельный (V) домен в ее аминоконцевой части, которая вносит вклад в антигенсвязывающий участок, и константный (C) домен, которым определяется изотип. Легкие цепи связаны с тяжелыми цепями многочисленными нековалентными взаимодей-

виями и дисульфидными связями, и V-участки тяжелых и легких цепей соединяются по два в каждом плече молекулы антитела, образуя два идентичных антигенсвязывающих участка. Как полагают, некоторые аминокислотные остатки образуют связь между переменными доменами легких и тяжелых цепей [см. Kabat et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. и Clothia et al. (1985), *J. Mol. Biol.*, vol. 186: 651].

Известно, что переменность неравномерно распределена на протяжении переменных доменов антител, но сконцентрирована в трех сегментах, называемых "участками, определяющими комплементарность" (CDR) или "гиперпеременными доменами", в переменных доменах как легкой цепи, так и тяжелой цепи. Наиболее консервативные части переменных доменов называются "каркасными участками" (FR). Каждый переменный домен нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR участка, соединенных тремя CDR. CDR в каждой цепи держатся вместе в непосредственной близости при помощи FR участков и, совместно с CDR других цепей, образуют антигенсвязывающий участок антитела [см. Kabat et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md.]. Совместно 6 CDR вносят вклад в связывающие свойства молекулы антитела по отношению к антигену. Однако даже отдельный переменный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфических к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген [см. Pluckthun (1994), в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, p. 269-315].

Термин "константный домен" обозначает С-концевой участок тяжелой или легкой цепи антитела. Как правило, константные домены не участвуют непосредственно в связывающих свойствах молекулы антитела по отношению к антигену, но демонстрируют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности. Здесь "эффекторные функции" обозначают различные физиологические эффекты антител (например, опсонизацию, лизис клеток, дегрануляцию тучных клеток, базофилов и эозинофилов и другие процессы), опосредованные рекрутированием иммунных клеток посредством молекулярного взаимодействия между Fc-доменом и белками иммунной системы. Изотип тяжелой цепи определяет функциональные свойства антитела. Их отличительные функциональные свойства сообщаются карбоксиконцевыми частями тяжелых цепей, где они не связаны с легкими цепями.

Как применяется в настоящем описании, "фрагмент антитела" обозначает часть интактного антитела, которая включает антигенсвязывающий участок или переменные домены интактного антитела, где указанная часть может быть лишена константных доменов тяжелой цепи (например, CH2, CH3 и CH4) Fc-участка интактного антитела. Альтернативно, части константных доменов тяжелой цепи (например, CH2, CH3 и CH4) могут входить в "фрагмент антитела". Примерами фрагментов антител являются те, которые сохраняют антигенсвязывание и включают Fab, Fab', F(ab')₂, Fd и Fv-фрагменты; димеры; тримеры; одноцепочечные молекулы антител (sc-Fv); миниантитела, нанотела и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В качестве примера Fab-фрагмент также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи.

Термин "вариант" обозначает аминокислотную последовательность, которая отличается от нативной аминокислотной последовательности антитела по меньшей мере на один аминокислотный остаток или модификацию. Нативная, или исходная, или дикого типа аминокислотная последовательность обозначает аминокислотную последовательность антитела, найденную в природе. "Вариант" молекулы антитела включает, без ограничения, изменения в переменном домене или константном домене легкой цепи и/или тяжелой цепи, включая гиперпеременный или CDR участок, Fc-участок, Fab-участок, CH1 домен, CH2 домен, CH3 домен и шарнирный участок.

Термин "специфический" обозначает избирательное связывание антитела с его эпитопом-мишенью. Молекулы антител могут быть протестированы на специфичность связывания путем сравнения связывания антитела с желаемым антигеном со связыванием антитела с неродственным антигеном, или аналогом антигена, или смесью антигенов при заданном наборе условий. Предпочтительно антитело в соответствии с настоящим изобретением не будет демонстрировать значительного связывания с неродственными антигенами или даже аналогами антигена-мишени. Здесь термин "антиген" обозначает молекулу, которую распознает и с которой связывается молекула антитела или иммунное средство, которое связывается с антигеном. Конкретная часть антигена, с которой связывается антитело, называется "эпитоп". "Гаптен" обозначает маленькую молекулу, которая может в большинстве случаев вызвать иммунную реакцию (т.е. действовать в качестве антигена), только когда она присоединена к молекуле-носителю, например белку, полиэтиленгликолю (ПЭГ), коллоидному золоту, силиконовым гранулам и тому подобному. Носитель может быть таким, который также не вызывает иммунную реакцию сам по себе.

Термин "антитело" применяется в самом широком смысле и охватывает моноклональные, поликлональные, мультиспецифические (например, биспецифические, в которых каждое плечо антитела реагирует с различными эпитопами, или того же самого, или разных антигенов), миниантитело, гетероконъюгат, димерные, тримерные, химерные и синтетические антитела, а также фрагменты антител, которые специфически связываются с антигеном с требуемыми свойствами связывания и/или биологической активностью.

Термин "моноклональное антитело" (mAb) обозначает антитело или совокупность сходных антител, полученное из совокупности практически гомогенных антител, и его не следует понимать в смысле необходимого получения антитела каким-либо специальным способом. Например, моноклональные антитела могут быть получены гибридомным способом, впервые описанным Kohler and Milstein (1975), *Nature*, vol. 256: 495-497, или способами с применением рекомбинантной ДНК.

Термин "химерное" антитело (или иммуноглобулин) обозначает молекулу, содержащую тяжелую и/или легкую цепь, которая идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител определенного вида или определенного класса или подкласса антител, тогда как остальная часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител другого вида или другого класса или подкласса антител, а также фрагменты таких антител, до тех пор, пока они проявляют необходимую биологическую активность [Cabilly et al. (1984), *infra*; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 6851].

Термин "гуманизированное антитело" обозначает формы антител, которые содержат последовательности нечеловеческих (например, мышиных) антител, а также человеческих антител. Гуманизированное антитело может включать консервативные аминокислотные замещения или неприродные остатки того же самого или другого вида, которые не изменяют значительно его связывающую и/или биологическую активность. Такими антителами являются химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность нечеловеческих иммуноглобулинов. Большей частью гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (реципиентное антитело), в которых остатки участка, определяющего комплементарность (CDR), реципиента замещены остатками CDR отличных от человека видов (донорское антитело), таких как мышь, крыса, верблюд, корова, коза или кролик, обладающие желаемыми свойствами. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не присутствуют ни в реципиентном антителе, ни в заимствованных последовательностях CDR или каркасных участков. Данные модификации производят для дальнейшего улучшения и максимизации эффективности антитела. Таким образом, как правило, гуманизированное антитело включает все переменные домены по меньшей мере из одного, а в одном аспекте двух доменов, в которых все или все из гипервариабельных петель соответствуют доменам нечеловеческого иммуноглобулина, и все или практически все из FR-участков являются участками последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело также необязательно содержит по меньшей мере часть константного домена (Fc) иммуноглобулина или таковой человеческого иммуноглобулина; см., например, Cabilly et al., патент США № 4816567; Cabilly et al., европейский патент № 0125023 B1; Boss et al., патент США № 4816397; Boss et al., европейский патент № 0120694 B1; Neuberger, M.S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M.S. et al., европейский патент № 0194276 B1; Winter, патент США № 5225539; Winter, европейский патент № 0239400 B1; Padlan, E.A. et al., европейская патентная заявка № 0519596 A1; Queen et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 86: 10029-10033).

Термин "биспецифическое антитело" может обозначать антитело или моноклональное антитело, обладающее способностью связывать по меньшей мере два различных эпитопа. В одном варианте осуществления эпитопы относятся к одному и тому же антигену. В другом варианте осуществления эпитопы относятся к двум различным антигенам. Способы получения биспецифических антител известны в данной области техники. Например, биспецифические антитела могут быть получены рекомбинантно с помощью коэкспрессии двух пар, состоящих из тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулинов. Альтернативно, биспецифическое антитело могут быть получены при помощи химического связывания. Биспецифические антитела включают биспецифические фрагменты антител.

Термин "гетероконъюгатное антитело" может обозначать два ковалентно связанных антитела. Такие антитела могут быть получены с помощью известных в синтетической белковой химии способов, в том числе с применением сшивающих агентов. Как применяется в настоящем описании, термин "конъюгат" обозначает молекулы, образованные ковалентным присоединением одного или нескольких фрагментов антител или связывающих средств к одной или нескольким полимерным молекулам.

Термин "биологически активный" обозначает антитело или фрагмент антитела, которое способно связываться с нужным эпитопом и в какой-то мере проявлять биологическое действие. Биологическое действие включает, без ограничения, модулирование сигнала роста, модулирование антиапоптотического сигнала, модулирование апоптотического сигнала, модулирование каскада эффекторной функции и модулирование других лигандных взаимодействий.

Термин "рекомбинантная ДНК" обозначает нуклеиновые кислоты и экспрессируемые ими генные продукты, которые были сконструированы, созданы или модифицированы людьми.

"Рекомбинантные" полипептиды или белки представляют собой полипептиды или белки, продуцируемые при помощи методов рекомбинантной ДНК, например, из клеток, трансформированных при помощи экзогенной конструкции ДНК, кодирующей желаемый полипептид или белок. "Синтетические" полипептиды или белки представляют собой полученные при помощи химического синтеза.

Термин "кассета экспрессии" обозначает нуклеотидную молекулу, способную воздействовать на экспрессию структурного гена (т.е. последовательности, кодирующей белок, такой как антитело настоящего изобретения) в хозяине, совместимом с такими последовательностями. Кассеты экспрессии вклю-

чают, по меньшей мере, промотор, функционально связанный с кодирующей полипептид последовательностью, и, необязательно, с другими последовательностями, например сигналами терминации транскрипции. Также могут применяться дополнительные регуляторные элементы, необходимые или полезные для воздействия на экспрессию, например энхансеры. Таким образом, кассеты экспрессии включают плазмиды, экспрессирующие векторы, рекомбинантные вирусы, все формы рекомбинантного вектора "оголенной ДНК" и тому подобное.

2. Применения.

Настоящее исследование относится к композициям и способам лечения или профилактики глазных болезней и патологических состояний при помощи одного или нескольких терапевтических средств, которые изменяют активность или концентрацию одного или нескольких нежелательных биоактивных липидов либо их предшественников или метаболитов. Терапевтические способы и композиции настоящего изобретения действуют посредством изменения эффективной концентрации, т.е. абсолютной, относительной, эффективной и/или доступной концентрации и/или активности, определенных нежелательных биоактивных липидов. Уменьшение эффективной концентрации биоактивного липида может быть названо "нейтрализацией" липида-мишени или его нежелательных эффектов, включая эффекты, связанные с передачей сигнала далее по каскаду. Здесь "нежелательный" обозначает биоактивный липид, который нежелателен по причине его вовлеченности в процесс заболевания, например, в качестве сигнальной молекулы или по причине нежелательного количества биоактивного липида, который вносит вклад в заболевание, когда присутствует в избытке.

Не связывая себя никакой определенной теорией, можно предположить, что неподходящие концентрации липидов, таких как S1P и/или ЛФК, и/или их метаболитов или эффекторов, участвующих в передаче сигнала далее по каскаду, могут вызывать или вносить вклад в развитие различных глазных болезней и нарушений. Как таковые, композиции и способы могут применяться для лечения указанных глазных болезней и нарушений, в частности, посредством уменьшения эффективной *in vivo* концентрации определенного липида-мишени, например S1P и/или ЛФК. В частности, предполагают, что композиции и способы настоящего изобретения полезны в лечении глазных болезней, характеризующихся, по меньшей мере частично, aberrантной неоваскуляризацией, ангиогенезом, фиброгенезом, фиброзом, рубцеванием, воспалением и иммунной реакцией.

Примеры нескольких типов глазных болезней, которые можно лечить в соответствии с настоящим изобретением, описаны ниже. Следует понимать, что многие болезни и патологические состояния характеризуются, по меньшей мере частично, многими патологическими процессами (например, как патологической неоваскуляризацией, так и рубцеванием), и что предлагаемые в настоящем описании классификации служат для удобства описания и не ограничивают настоящее изобретение.

Ишемические ретинопатии, связанные с патологической неоваскуляризацией, и заболевания, характеризующиеся образованием эпиретинальной и/или субретинальной мембраны.

Ишемические ретинопатии (ИР) представляют собой широкую группу нарушений, характеризующихся нарушенным ретинальным кровотоком. Примеры ИР включают диабетическую ретинопатию (ДР), ретинопатию недоношенных (РН), серповидно-клеточную ретинопатию и ретинальную венооклюзионную болезнь. Все указанные нарушения могут быть связаны с вызываемой VEGF пролиферацией патологической ретинальной неоваскуляризации, которая может окончательно привести к внутриглазному кровоизлиянию, образованию эпиретинальной мембраны и тракционному отслоению сетчатки. Идиопатические эпиретинальные мембраны (ERM), также называемые макулярной складкой или целлофановой ретинопатией, могут вызывать ухудшение зрения вслед за искажением ретинальной структуры. Указанные мембраны иногда появляются вновь, несмотря на хирургическое удаление и иногда связаны с ретинальной ишемией. VEGF и его рецепторы локализованы в ERM. Наличие VEGF в мембранах, связанных с пролиферативной диабетической ретинопатией, пролиферативной витреоретинопатией и макулярной складкой, позволяет, помимо прочего, предположить, что данный цитокин играет важную роль в ангиогенезе при ишемическом ретинальном заболевании и в росте мембран при пролиферативных витреоретинальных нарушениях. Кроме того, рецепторы VEGF, VEGFR1 и VEGFR2 идентифицированы также в клетках в ERM. Указанные данные показывают, что VEGF может представлять собой аутокринный и/или паракринный стимулятор, который может вносить вклад в развитие васкулярных и аваскулярных ERM. PDGF и его рецепторы [Robbins et al. (1994), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*; vol. 35: 3649-3663] были описаны в исследованиях глаз с пролиферативными ретинальными заболеваниями [Cassidy et al. (1998), *Br. J. Ophthalmol.*; vol. 82: 181-85 и Freyberger et al. (2000), *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, vol. 108: 106-109]. Данные результаты позволяют предположить, что лиганды и рецепторы PDGF широко представлены в пролиферативных ретинальных мембранах различного происхождения, и предположить, что аутокринная и паракринная стимуляция с помощью PDGF может участвовать в патогенезе ERM. Трансформирующий фактор роста- β (TGF- β) участвует в образовании ERM [Pournaras et al. (1998), *Klin Monatsbl Augenheilkd*, vol. 212: 356-358], что показано при помощи окрашивания TGF и иммунореактивности. Кроме того, рецептор TGF- β II экспрессируется в миофибробластах ERM диабетической и ПВР мембран. Данные результаты позволяют предположить, что TGF- β , продуцируемый во многих типах

клеток в ретине и ERM, является привлекательной мишенью для лечения ПБР, диабетической и вторичной ERM. Сообщалось, что содержание интерлейкина-6 (IL-6) увеличивается в человеческом стекловидном теле при пролиферативной диабетической ретинопатии (ПДР) [La Heij et al. (2002), *Am. J. Ophthalmol.*, 134: 367-375], и в одном исследовании 100% исследованных диабетических ERM экспрессировали белок IL-6 [Yamamoto et al. (2001) *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 132: 369-377].

Показано, что экзогенное применение основного фактора роста фибробластов (bFGF) индуцирует эндотелиальную пролиферацию и экспрессию VEGF [Stavri et al. (1995), *Circulation*, vol. 92: 11-14]. В соответствии с данными наблюдениями концентрация bFGF возрастает в образцах стекловидного тела пациентов с ПДР [Sivalingam et al. (1990), *Arch. Ophthalmol.*, vol. 108: 869-872 и Boulton et al. (1997), *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 81: 228-233]. bFGF также участвует в образовании ERM [Hueber et al. (1996), *Int. Ophthalmol.*, vol. 20: 345-350], продемонстрировавших наличие bFGF в 8 из 10 исследованных ПДР мембран. Более того, указанные исследователи обнаружили положительное окрашивание по отношению к соответствующему рецептору FGFR1. Иммунореактивность по отношению к bFGF также была продемонстрирована в невазкулярных идиопатических ERM. Данные результаты означают участие bFGF в образовании как васкулярных, так и аваскулярных ERM [Harada et al. (2006), *Prog in Retinal and Eye Res.*, vol. 25: 149-164]. Высокий уровень bFGF также был детектирован в сыворотке пациентов с PH (Becerril et al. (2005), *Ophthalmology*, vol. 112, 2238].

С учетом известных плеотропных эффектов S1P и его взаимодействия с VEGF, bFGF, PDGF, TGF- β и IL-6 можно предположить, что средство, которое связывает, противодействует, ингибирует действие или производство S1P, будет эффективно в подавлении патологической ретиальной неоваскуляризации при ишемических ретинопатиях и заболеваниях заднего сегмента глаза, характеризующихся васкулярным или аваскулярным образованием ERM. Другие глазные патологические состояния, характеризующиеся, по меньшей мере частично, aberrантной неоваскуляризацией или ангиогенезом, включают возрастную макулярную дегенерацию, отторжение роговичного трансплантата, неоваскулярную глаукому, переутомление от контактных линз, инфекции роговой оболочки, включая простой герпес, опоясывающий герпес и протозойные инфекции, птеригиум, инфекционный увеит, хроническое отслоение сетчатки, повреждение лазером, серповидно-клеточную ретинопатию, веноокклюзионную болезнь, хориоидальную неоваскуляризацию, ретиальную ангиоматозную пролиферацию и идиопатическую полипозидную хориоидальную васкулопатию.

Пролиферативная витреоретинопатия (ПБР).

ПБР наблюдается после спонтанного регматогенного отслоения сетчатки и после травматического отслоения сетчатки. Она является основной причиной неэффективности хирургии отслоения сетчатки. Ее характеризует рост и сокращение клеточных мембран с обеих сторон ретины на задней поверхности стекловидного тела и основании стекловидного тела. Такое избыточное развитие рубцовой ткани в глазу может вести к развитию тракционного отслоения сетчатки и поэтому терапия, направленная на предотвращение или ингибирование пролиферативной витреоретинопатии (ПБР), представляет собой логический принцип лечения отслоения сетчатки. Гистопатологически ПБР характеризуется избыточным производством коллагена, сокращением и клеточной пролиферацией [Michels, *Retinal Detachment 2nd Edition*. Wilkinsin C.P., Rice T.A. Eds, *Complicated types of retinal detachment*, p. 641-771, Mosby St. Louis 1997]. Типы клеток, идентифицированные в ПБР мембранах, включают, главным образом, клетки ретиального пигментного эпителия, фибробласты, макрофаги и сосудистые эндотелиальные клетки [Jerdan J.A. et al. (1989), *Ophthalmology*, vol. 96: 801-10 и Vidinova et al. (2005), *Klin Monatsbl Augenheilkd*; vol. 222: 568-571]. Патофизиология данной избыточной реакции рубцевания, как оказывается, опосредована рядом цитокинов, включая тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста (TGF) бета, основной фактор роста фибробластов (bFGF), интерлейкин-6 (IL-6) и интерлейкин-8 (IL-8) [Nagineni et al. (2005), *J. Cell Physiol.*, vol. 203: 35-43; La Heij et al. (2002), *Am. J. Ophthalmol.*, 134: 367-75; Planck et al. (1992), *Curr. Eye Res.*; vol. 11: 1031-9; Canataroglu et al. (2005) *Ocul. Immunol. Inflamm.*; vol. 13: 375-81 и Andrews et al. (1999) *Ophthalmol. Vis. Sci.*; vol. 40: 2683-9]. Ингибирование данных цитокинов может помочь предупредить развитие ПБР при своевременном применении или ограничить его тяжесть [Akiyama et al. (2006), *J. Cell Physiol.*, vol. 207: 407-12 и Zheng Y. et al. (2003), *Jpn. J. Ophthalmol.*, vol. 47: 158-65].

Сфингозин-1-фосфат (S1P) представляет собой биоактивный лизолипид с плеотропным действием. Он является проангиогенным, провоспалительным (стимулирует рекрутинг макрофагов и тучных клеток) и профибротическим (стимулирует образование рубца). S1P обычно стимулирует клетки к пролиферации и миграции и является антиапоптотическим. S1P выполняет данные биологически различные функции посредством взаимодействия с многочисленными цитокинами и факторами роста. Продemonстрировано, что ингибирование S1P с помощью моноклонального антитела (сфингомаб) блокирует функции фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), bFGF, IL-6 и IL-8 [Visentin B. et al. (2006), *Cancer Cell*, vol. 9: 1-14]. Связывание S1P с рецептором S1P₁ также может повышать производство PDGF; следовательно, можно ожидать, что средство, которое связывается с S1P, также будет уменьшать производство PDGF [Milstien and Spiegel (2006), *Cancer Cell*, vol. 9: 148-150]. Как показано в примерах ниже, в настоящее время было продемонстрировано, что *in vitro* S1P трансформирует человеческие РПЭ клетки в миофибробластподоб-

ный фенотип, схожий с типом, наблюдаемым при ПВР. С учетом патофизиологии, которая в результате приводит к избыточному рубцеванию, наблюдаемому при ПВР, и известного воздействия S1P на те же самые ключевые медиаторы, можно предположить, что средство, которое связывает, противодействует или ингибирует действие или производство S1P, будет эффективно в устранении или минимизировании развития ПВР и ее тяжелого повреждающего действия на глаз.

Увеит.

Увеит представляет собой воспалительное нарушение увеального тракта глаза. Он может повлиять на передний (антериорный) или задний (постериорный) сегменты глаза, или на оба. Он может быть идиопатическим или инфекционным по этиологии и может быть опасен для зрения. Идиопатический увеит связан с увеличенной экспрессией CD4 + в передней камере [Calder et al. (1999), *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 40: 2019-24]. Данные также позволяют предположить патологическую роль Т-лимфоцитов и их хемоаттрактанта IP-10 в патогенезе увеита [Abu El-Asrar (2004), *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 138: 401-11]. Другие хемокины при остром переднем увеите включают воспалительные белки макрофагов, хемоаттрактантный белок моноцитов-1 и IL-8. Указанные цитокины, вероятно, играют решающую роль в рекрутинге лейкоцитов при остром переднем увеите [Verma et al. (1997), *Curr. Eye Res.*; vol. 16: 1202-8]. С учетом глубокого и плеотропного эффекта сигнального каскада S1P можно предположить, что сфингомаб и другие иммунные средства, которые уменьшают эффективную концентрацию биоактивного липида, могут служить эффективным способом уменьшения или модулирования внутриглазного воспаления, связанного с увеитом.

Рефракционная хирургия.

Реакция заживления ран роговицы особенно важна в методах рефракционной хирургии, поскольку она представляет собой основной определяющий фактор безопасности и эффективности. Данные методы применяют для лечения миопии, гиперопии и астигматизма. Лазерный *in situ* кератомилез (LASIK) и фоторефрактивная кератэктомия (ФРК) являются наиболее распространенными рефракционными методами, однако в попытке преодолеть сложности были разработаны другие методы. Указанные сложности включают, помимо других, гиперкоррекцию, недостаточную коррекцию, регрессию и стромальное помутнение.

Количество обычных сложностей связано с реакцией заживления, и имеет свои корни в биологическом ответе на хирургическое вмешательство. Одна из серьезнейших проблем в роговичной биологии заключается в том, чтобы стимулировать восстановление ткани путем регенерации, а не фиброза. Можно предположить, что выбор между регенерацией и фиброзом осуществляется через контроль активации фибробластов [Stramer et al. (2003), *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*; vol. 44: 4237-4246 и Fini (1999) *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 18: 529-551]. Клетки, называемые миофибробластами, могут появляться в субэпителиальной строме через 1-2 недели после оперативного вмешательства или повреждения. Миофибробласты, предположительно, происходят от кератоцитов под воздействием TGF- β [Jester et al. (2003) *Exp. Eye Res.*, vol. 77: 581-592]. Роговичное помутнение и стромальное рубцевание характеризуются уменьшенной прозрачностью роговицы и могут быть связаны с генерацией фибробластов и миофибробластов. Исследования *in situ* и *in vitro* позволили предположить, что TGF- β и PDGF играют важную роль в стимуляции дифференциации миофибробластов [Folger et al. (2001), *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*; 42: 2534-2541]. На центральной поверхности роговицы при определенных условиях может быть замечено помутнение после LASIK. Оно включает диффузный ламеллярный кератит, кольцевые лоскуты и сохранение эпителиального дебриса на границе. Представляется вероятным, что все это связано с увеличением количества полученного активированными кератоцитами от эпителиальных клеток TGF- β [Netto et al. (2005), *Cornea*, vol. 24: 509-522]. Регрессия, скорее всего, обусловлена повышенным эпителиально-стромальным заживляющим раны взаимодействием, таким как увеличенное производство модулирующих эпителий факторов роста роговичными фибробластами и/или миофибробластами [Netto et al. (2005), *Cornea*, vol. 24: 509-522]. Показано, что ингибирование связывания TGF- β с рецепторами топическим антителом против TGF- β уменьшает помутнение, вызванное ФРК [Jester et al. (1997), *Cornea*, vol. 16: 177-187]. Учитывая известное воздействие антитела против биоактивного липида на процесс фиброза и TGF- β , авторы полагают, что оно может помочь в лечении некоторых осложнений при рефракционной хирургии, таких как помутнение, стромальное рубцевание и регрессия.

Модулирование фильтрующей хирургии глаукомы.

Глаукому классически считают заболеванием, при котором повышенное внутриглазное давление вызывает повреждение зрительного нерва и, в конце концов, нарушение поля зрения и/или остроты зрения. Существуют другие формы глаукомы, при которых повреждение зрительного нерва может происходить в условиях нормального давления, или так называемая "глаукома нормального давления". Для многих пациентов существует возможность контролировать их заболевание при помощи медикаментов, но для других необходима фильтрующая хирургия глаукомы, при которой в глазу хирургически создается фистула для того, чтобы дать возможность вытечь жидкости. Это может быть произведено при помощи трабекулэктомии, имплантации медицинского устройства или другими способами хирургического вмешательства. Фильтрующая хирургия глаукомы неэффективна по причине процесса заживления

ран, характеризуемого пролиферацией фибробластов и, в конечном счете, рубцеванием. Антиметаболиты, такие как 5-фторурацил и митомицин С, могут уменьшать последующее рубцевание; однако даже при применении данных препаратов продолжительное последующее наблюдение показывает, что неэффективность оперативного вмешательства остается все еще серьезной клинической проблемой [Mutsch and Grehn (2000), Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.; vol. 238: 884-91 и Fontana et al. (2006), Ophthalmology, vol. 113: 930-936]. Исследования фибробластов теноновой капсулы человека продемонстрировали, что они обладают способностью синтезировать bFGF, и PDGF, и TGF- β , и что данные факторы роста вовлечены в процесс восстановления ткани после фильтрующей хирургии глаукомы, что определяет неспособность указанного метода [Trpathi et al. (1996), Exp. Eye Res., vol. 63: 339-46]. Дополнительные исследования также продемонстрировали вовлечение указанных факторов роста в постфильтрационную реакцию раны [Denk et al. (2003), Curr. Eye Res.; vol. 27: 35-44], позволяя сделать вывод, что различные изоформы PDGF являются сильными стимуляторами пролиферации фибробластов теноновой капсулы после фильтрующей хирургии глаукомы, тогда как TGF- β существенен для трансформации фибробластов теноновой капсулы в миофибробласты. Авторы продемонстрировали, что S1P присутствует в фибробластах теноновой капсулы/конъюнктивы человека и что S1P сильно экспрессируется при реакции заживления ран. S1P также стимулирует профибротическую функцию многочисленных клеточных типов фибробластов и трансформацию в миофибробластный фенотип и производство коллагена. С учетом специфического плеотропного действия S1P и его известного взаимодействия с bFGF, PDGF и TGF- β можно предположить, что средство, которое связывает, противодействует, ингибирует действия или производство S1P, или может быть других биоактивных липидов, таких как ЛФК, окажется эффективным в модулировании реакции заживления ран и/или фиброза, которая ведет к неспособности/неэффективности хирургии глаукомы, и окажется эффективным терапевтическим способом увеличения количества успешных результатов оперативного вмешательства. Можно представить, что средство может быть введено, например, через интравитреальную или субконъюнктивальную инъекцию или местно.

Трансплантация роговицы.

Трансплантация роговицы (сквозная кератопластика (PK)) является наиболее успешным методом трансплантации ткани у человека. Хотя 47000 роговичных трансплантатов производят ежегодно в Соединенных Штатах Америки, отторжение роговичного аллотрансплантата все еще остается главной причиной неэффективности роговичной трансплантации [Ing J.J. et al. (1998), Ophthalmology, vol. 105: 1855-1865]. В настоящее время авторы не имеют возможности предотвратить отторжение аллотрансплантата, хотя иммуносупрессия и иммуномодуляция могут оказаться многообещающими подходами. Недавно было обнаружено, что CD4(+) Т-клетки действуют непосредственно в качестве эффекторных клеток, а не хелперных клеток при отторжении роговичных аллотрансплантатов [Hegde S. et al. (2005), Transplantation, vol. 79: 23-31]. Исследования на мышах показали увеличенное количество нейтрофилов, макрофагов и тучных клеток в строме роговицы, подвергающейся отторжению. Макрофаги являлись основным типом инфильтрирующих клеток, за ними следуют Т-клетки, тучные клетки и нейтрофилы. Ранняя экспрессия хемокинов при высоком риске роговичной трансплантации оказалась экспрессией мышинового гомолога IL-8 (воспалительного белка макрофагов-2) и хемоаттрактантного белка моноцитов-1 (MCP-1) [Yamagami S. et al. (2005), Mol. Vis., vol. 11, 632-40].

FTY720 (FTY) является новым иммуносупрессорным препаратом, который действует посредством изменения миграции лимфоцитов, приводящему к лимфопении периферической крови и увеличенному числу лимфоцитов в лимфотических узлах. FTY опосредует свое иммуномодулирующее действие посредством связывания с некоторыми из рецепторов S1P, экспрессирующимися на лимфоцитах [Bohler T. et al. (2005), Transplantation, vol. 79: 492-5]. Препарат вводится перорально, и одна оральная доза уменьшает число периферических лимфоцитов на 30-70%. FTY уменьшает Т-клеточную субпопуляцию, CD4(+) -клетки сильнее, чем CD8(+) -клетки [Bohler et al. (2004), Nephrol. Dial Transplant, vol. 19: 702-13]. Мыши, подвергавшиеся воздействию FTY, показали значительное продление срока жизнеспособности ортотопических роговичных трансплантатов при пероральном введении [Zhang et al. (2003), Transplantation, vol. 76: 1511-3]. Пероральное введение FTY также значительно замедляет отторжение и уменьшает его тяжесть в модели роговичной ксенотрансплантации от крыс мышам [Sedlakova et al. (2005), Transplantation, vol. 79, 297-303]. С учетом известного патогенеза отторжения аллотрансплантата и данных, позволяющих предположить, что модулирование эффектов S1P сигнализации может улучшить жизнеспособность роговичного трансплантата, можно предположить, что иммунные средства, которые уменьшают эффективную концентрацию биоактивных липидов, например сфингомаб, также будут полезны при лечении иммунологических состояний, таких как отторжение аллотрансплантата, например, посредством ослабления иммунной реакции, и, следовательно, вероятно улучшат жизнеспособность роговичного трансплантата после РК. Лекарственное средство может также обладать дополнительным преимуществом тем, что в дополнение к системному введению может быть возможно локальное введение, например, путем местного окологлазного или внутриглазного применения.

Другие глазные болезни с воспалительным или иммунным компонентом включают хронический витрит, инфекционные заболевания, включая простой герпес, опоясывающий герпес и протозойные ин-

фекции, и глазной гистоплазмоз.

Заболевания переднего сегмента, характеризующиеся рубцеванием.

Можно предположить, что лечение при помощи антитела, направленного на биоактивный липид, также улучшит некоторые патологические состояния, характеризующиеся рубцеванием передней части глаза. Указанные состояния включают следующие позиции.

Травма.

Роговица как наиболее передняя структура глаза подвержена различным вредным факторам, от взвешенных в воздухе частиц до тупой травмы, что может приводить к механической травме. Роговица и передняя поверхность глаза также могут подвергаться другим формам травмы от хирургического и химического, такого как кислотное и щелочное, повреждений. Результаты данного типа повреждений могут быть разрушительными, что часто приводит к образованию рубцовой перемычки между роговицей и конъюнктивой при симблефароне. Кроме того, может последовать роговичная неоваскуляризация. Нейтрофилы скапливаются, выброс ими лейкотриенов, как и присутствие интерлейкина-1 и интерлейкина-6, служит рекрутингу следующих волн воспалительных клеток [Sotozono et al. (1997), *Curr. Eye Res.*, vol. 19: 670-676], инфильтрирующих роговицу и выбрасывающих протеолитические ферменты, которые приводят к большому повреждению и разрушению роговичной ткани и растворению роговицы. Кроме того, фибробласты роговицы и конъюнктивы активируются и распространяются, что приводит к отложению коллагена и фиброзу. Нежелательный эффект чрезвычайного воспаления и рубцевания стимулируется TGF- β [Saika S. et al. (2006), *Am. J. Pathol.* vol. 168, 1848-60]. Данный процесс ведет к потере прозрачности роговицы и поражению зрения. Уменьшение воспаления, включая уменьшение инфильтратов нейтрофилов и уменьшение фиброза, приводит к более быстрому и более полному заживлению в модели роговицы, обожженной щелочью, на мышах [Ueno et al. (2005), *Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 46: 4097-106].

Глазной рубцующий пемфигоид (ОСР).

ОСР представляет собой хроническое рубцующее (образующее рубец) аутоиммунное заболевание, которое, в первую очередь, поражает конъюнктиву. Заболевание неизменно прогрессирует, и прогноз является достаточно плохим. На последней стадии рубцевание конъюнктивы и связанная кератопатия приводят к двусторонней слепоте. Гистологически конъюнктивa показывает подслизистое рубцевание и хроническое воспаление, в котором участие тучных клеток является неожиданно большим [Yao L. et al. (2003), *Ocul. Immunol. Inflamm.*, vol. 11: 211-222]. Аутоантигены приводят к образованию аутоантител. Связывание аутоантитела с аутоантигеном приводит в движение сложный ряд событий с инфильтрацией Т-лимфоцитов, где CD4 (хелперные) клетки сильно превосходят численностью CD8 (супрессорные) клетки. Также следует инфильтрация макрофагов и тучных клеток, а также выброс провоспалительных и профибротических цитокинов. Вызванная цитокинами пролиферация и активация фибробластов конъюнктивы приводит в результате к субэпителиальному фиброзу (см. примеры ниже). Исследования показали роль TGF- β и IL-1 в фиброзе конъюнктивы у пациентов с ОСР [Razaque M.S. et al. (2004), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 45: 1174-81].

Синдром Стивенса-Джонсона (ССД) и токсический эпидермальный некролиз (ТЭН).

ССД и ТЭН представляют собой угрожающие жизни побочные реакции на медикаменты. Глазные осложнения двух указанных родственных патологических состояний могут быть тяжелыми и вызывать патологические изменения бульбарной и пальпебральной конъюнктивы, век и роговицы. Лекарственные средства и инфекции представляют собой наиболее распространенные ускоряющие факторы. Хронические изменения в глазу включают рубцевание, образование симблефарона и образование рубца на конъюнктиве в результате первичного воспалительного процесса. Они ведут к образованию энтропиона, трихиазу и нестабильности слезной пленки. Разрушение глазной поверхности ведет к роговичному рубцеванию, неоваскуляризации и в тяжелых случаях к кератинизации. Как и при ОСР происходит субэпителиальный фиброз конъюнктивы. Полагают, что аутоиммунная реакция лимфоцитов стекловидного тела на лекарственные средства или инфекцию играет роль в развитии ССД/ТЭН [Harilaos et al. (2005), *Erythema Multiforme, Stevens Johnson Syndrome, and Toxic Epidermal Necrolysis*, in *Cornea* 2nd edition. Krachmer, Mannis, Holland eds. Elsevier Mosby Philadelphia]. Инфильтрирующая популяция клеток при ССД включает макрофаги, CD4-положительные Т-клетки и CD8-положительные Т-клетки. Данные популяции клеток схожи с наблюдаемыми при химическом повреждении [Kawasaki et al. (2000), *J. Ophthalmol.*, vol. 84: 1191-3].

Птеригиум.

Клинически птеригиум представляет собой мясистую сосудистую массу, которая находится в щели между веками. Тело птеригиума представляет собой мясистую сосудисто-волокнистую массу. Активные птеригиумы характеризуются значительным сосудистым застоем и прогрессирующим ростом. Они крепко присоединены к главному яблоку. В запущенных случаях птеригиум захватывает роговицу и может вызвать потерю зрения следом за потерей роговичной прозрачности вдоль зрительной линии или неправильным астигматизмом. Симптоматически пациенты могут испытывать ощущение постороннего тела, слезоотделение и затуманенное зрение. Гистопатология демонстрирует гиалинизацию субэпителиальной соединительной ткани собственного вещества, увеличенное количество фибробластов и увеличенное

количество тучных клеток [Butrus et al. (1995), *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 119: 236-237]. Лечение птеригиума остается проблематичным. Обычно производят хирургическое вырезание, однако высока частота рецидивов (Krag et al. (1992), *Acta Ophthalmol.*, vol. 70: 530]. Для того чтобы помочь уменьшить частоту рецидивов птеригиума, применяли различные фармакологические адъюванты, такие как митомицин-С и даунорубицин. Хотя это может помочь, данные за длительный период времени ограничены, а это может оказаться связанным с истончением склеры и растворением роговицы; Dougherty et al. and Lee et al. [Dougherty et al. (1996), *Cornea*, vol. 15: 537-540 и Lee et al. (2001), *Cornea*, vol. 20: 238-42] были первыми, кто продемонстрировал, что VEGF может играть важную роль в развитии птеригиума, и кто идентифицировал VEGF и оксид азота в эпителии птеригиума. Указанные исследователи предположили, что эти, а также другие цитокины, ответственны за сосудисто-волокнутое врастание, являющееся особенностью птеригиума. Было продемонстрировано наличие основного FGF и TGF- β 1 как в первичном, так и в рецидивном птеригиуме [Kira et al. (1998), *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 236: 702-8], а опубликованные морфометрические и иммуногистохимические данные еще больше поддерживают точку зрения, что ангиогенез может играть роль в образовании птеригиума [Marcovich et al. (2002), *Curr. Eye Res.*, vol. 25: 17-22]. Другие исследования позволили считать IL-6 и IL-8, а также VEGF, медиаторами, которые могут иметь отношение к развитию птеригиума [Di Girolamo et al. (2006), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 47: 2430-7]. Эффективное средство против образования и роста птеригиума может уменьшить необходимость хирургического вмешательства или понизить частоту рецидивов.

Другие глазные болезни и патологические состояния, при которых происходит фиброгенез, фиброз или рубцевание, включают ВМД, диабетическую ретинопатию, ретинопатию недоношенных, серповидно-клеточную ретинопатию, ишемическую ретинопатию, ретинальную веноокклюзионную болезнь и переутомление от контактных линз.

Таким образом, избыточное рубцевание является основным компонентом патофизиологии многих глазных и неглазных болезней и патологических состояний. Биоактивные липиды, такие как S1P и ЛФК, играют роль в данном процессе, а лечение с помощью антител, направленное на уменьшение концентрации данного средства, вероятно, приведет к благоприятному терапевтическому эффекту для пациентов, подвергающихся лечению. В одном варианте осуществления полагают, что ингибиторы биоактивных липидов, в частности моноклональные антитела, направленные против S1P и/или ЛФК, полезны в модулировании реакций заживления хирургических и травматических ран.

Антитела против S1P и против ЛФК для лечения склеродермии.

Композиции и способы настоящего изобретения будут полезны в лечении нарушений и заболеваний, характеризующихся, по меньшей мере частично, аберрантной неоваскуляризацией, ангиогенезом, фиброгенезом, фиброзом, рубцеванием, воспалением и иммунной реакцией. Одним из таких заболеваний является склеродермия, которую также называют системным склерозом.

Склеродермия представляет собой аутоиммунное заболевание, которое вызывает рубцевание или утолщение кожи и иногда охватывает другие части тела, включая легкие, сердце и/или почки. Склеродермия характеризуется образованием рубцовой ткани (фиброз) в коже и органах тела, которое может привести к утолщению и твердости вовлеченных областей с последующим снижением функциональности. В настоящее время приблизительно 300000 американцев страдают склеродермией в соответствии с Scleroderma Foundation. Одна треть из них или меньше страдают от системного заболевания, тогда как остальные две трети в основном демонстрируют кожные симптомы. Когда заболевание захватывает легкие и вызывает рубцевание, дыхание может стать ограниченным, поскольку легкие не могут больше расширяться настолько, насколько необходимо. Для измерения возможности дыхания врачи применяют приспособление, которое определяет форсированную жизненную емкость (ФЖЕ). Среди людей с ФЖЕ меньше, чем 50% от ожидаемого показателя, 10-летний уровень смертности от вызванного склеродермией заболевания легких составляет приблизительно 42%. Одной из причин того, что уровень смертности столь высок, является то, что в настоящее время отсутствуют эффективные способы лечения.

Как описано в примерах в настоящей заявке, существующие данные демонстрируют, что S1P и ЛФК являются профибротическими факторами роста, которые могут внести вклад в активацию и пролиферацию фибробластов и получаемую в результате повышенную активность фибробластов, связанную с неадаптивным рубцеванием и ремоделированием. Более того, продемонстрирована существенная роль S1P и ЛФК в активности фибробластов кожи и фибробластов других типов. Например, было показано, что ЛФК стимулирует миграцию фибробластов кожи мышей (Noma, et al., *J. Biol. Chem.* 2004 Apr. 23; 279(17): 17634-9), а фибробласты кожи человека экспрессируют несколько подтипов рецепторов S1P (Zhang, et al., *Blood*. 1999 May 1; 93(9): 2984-90). Помимо различного прямого воздействия S1P на активность фибробластов, S1P также может оказывать различные не прямые возможные воздействия на активность фибробластов. Например, S1P может ослаблять действие других хорошо известных профибротических факторов, таких как TGF- β и тромбоцитарный фактор роста (PDGF). TGF- β представляет собой один из наиболее широко изученных и признанных факторов, способствующих фиброзу (Desmoujliere, et al., *J. Cell Biol.* 122: 103-111, 1993). TGF- β усиливает экспрессию и активность SphK1, что ведет к повышению экспрессии тканевых ингибиторов металлопротеиназы 1 (TIMP-1), белка, который ингибирует

деградацию ECM (Yamanaka, et al., J. Biol. Chem. 279: 53994-54001, 2004). Повышенная экспрессия TIMP-1 связана с интерстициальным фиброзом и диастолической дисфункцией у пациентов с сердечной недостаточностью (Heymans, et al., Am. J. Pathol. 166: 15-25, 2005). И, наоборот, S1P стимулирует экспрессию и выброс TGF- β (Norata, et al., Circulation 111: 2805-2811, 2005). Также существуют прямые доказательства взаимного влияния между S1P и PDGF. S1P непосредственно стимулирует экспрессию PDGF (Usui, et al., J. Biol. Chem. 279: 12300-12311, 2004). Кроме того, рецептор S1P1 и рецептор PDGF связываются друг с другом, и их комплекс необходим для активации с помощью PDGF передачи сигнала вниз по каскаде, которая вносит вклад в пролиферацию и миграцию различных типов клеток (Long, et al., Prostaglandins Other Lipid Mediat. 80: 74-80, 2006; Baudhuin et al., Faseb J. 18: 341-343, 2004). Как таковое действие TGF- β и PDGF на фиброз может частично объясняться перекрестным действием с сигнальным путем S1P. Как таковые композиции и способы настоящего изобретения могут применяться для лечения склеродермии, в частности, путем уменьшения эффективной *in vivo* концентрации определенного липида-мишени, например S1P и/или ЛФК.

Полагают, что системная склеродермия обостряется стимулирующими аутоантителами против рецепторов PDGF (Baroni, et al., N. Engl. J. Med., 2006, v. 354(25): 2667-76), и происходит повышение уровня рецепторов PDGF в фибробластах склеродермии в ответ на TGF- β (Yamakage, et al., J. Exp. Med., 1992 May 1, 175(5): 1227-34). Из-за существенного взаимного влияния сигнальных систем S1P, PDGF и TGF- β блокирование биологической активности S1P при помощи средства против S1P (например, mAb против S1P) может опосредованно ослабить просклеротическое действие PDGF и TGF- β . Более того, лечение таким средством против S1P может оказать благоприятное действие на пациентов со склеродермией посредством ослабления прямого воздействия S1P на фибробласты кожи и другие формы фибробластов, которые вносят вклад в развитие заболевания.

3. Способы введения.

Лечение заболеваний и патологических состояний, таких как приведенные выше примеры, может осуществляться при помощи разнообразных способов введения с использованием различных композиций и приспособлений. Подходящие фармацевтически приемлемые разбавители, носители и эксципиенты хорошо известны в данной области техники. Специалист в данной области техники должен понимать, что количества, которые будут вводиться в любом конкретном лечебном протоколе, могут легко быть определены. Можно ожидать, что подходящие количества будут находиться в диапазоне от 10 мкг/доза до 10 г/доза, предпочтительно от 10 мг/доза до 1 г/доза.

Лекарственное вещество можно вводить при помощи технологий, известных в данной области техники, включая, без ограничения, системное, подкожное, внутрикожное, мукозальное, в том числе с помощью ингаляции, и местное применение. Слизистая оболочка обозначает эпителиальную ткань, которая выстилает внутренние полости тела. Например, слизистая оболочка охватывает желудочно-кишечный тракт, включая ротовую полость, пищевод, желудок, кишечник и анальное отверстие; дыхательные пути, включая носовой ход, трахею, бронхи и легкие; и гениталии. Для целей данной спецификации слизистая оболочка также включает внешнюю поверхность глаза, т.е. роговицу и конъюнктиву. Локальное применение (в отличие от системного применения) может быть предпочтительным, потому что данный подход может ограничить возможное системное побочное действие, но, тем не менее, дает терапевтический эффект.

Фармацевтические композиции, применяемые в настоящем изобретении, включают, но без ограничения, растворы, эмульсии и композиции, содержащие липосомы. Указанные композиции могут быть созданы из множества компонентов, которые включают, но без ограничения, заранее подготовленные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества.

Фармацевтические композиции, применяемые в настоящем изобретении, могут быть получены в соответствии с общепринятыми технологиями, хорошо известными в фармацевтической промышленности. Такие технологии включают стадию смешивания активных ингредиентов с фармацевтическим носителем(ями) или эксципиентом(ами). Предпочтительные носители включают носители, которые являются фармацевтически приемлемыми, особенно когда композиция предназначена для терапевтического применения на людях. Для лечебных применений не к человеку (например, в лечении домашних животных, скота, рыб или птиц) можно применять ветеринарно приемлемые носители. Как правило, композиции получают путем равномерного и однородного смешивания активных ингредиентов с жидкими носителями, или мелкоизмельченными твердыми носителями, или и теми, и другими, и затем, если необходимо, придания продукту формы.

Композиции настоящего изобретения могут быть составлены в любой из многих возможных форм дозировки, таких как, без ограничения, таблетки, капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели, суппозитории и клизмы. Композиции настоящего изобретения могут также быть составлены в виде суспензий в водных, неводных или смешанных средах. Водные суспензии могут, кроме того, содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, включая, например, натрийкарбоксиметилцеллюлозу, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции могут быть составлены и приме-

нены в виде пен. Фармацевтические пены включают композиции, такие как, без ограничения, эмульсии, микроэмульсии, кремы, желе и липосомы.

Будучи в основном схожими по природе, данные композиции различаются по составу и консистенции конечного продукта. Ноу-хау получения таких композиций и составов, как правило, известно специалистам в фармацевтической и композиционной технике и может быть применено к составлению композиций настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления иммунное средство может доставляться в глаз посредством, например, каплей или мази для местного применения, окологлазной инъекции, внутрикамерно в переднюю камеру или стекловидное тело, посредством имплантируемого депо, или системно посредством инъекции или перорального введения. Количество применяемого антитела может легко быть определено специалистом в данной области техники.

Традиционные подходы к доставке препаратов в глаз включают местное применение, перераспределение в глаз вслед за системным применением или прямыми внутриглазными/окологлазными инъекциями [Sultana et al. (2006), *Current Drug Delivery*, vol. 3: 207-217; Ghate and Edelhauser (2006), *Expert Opinion*, vol. 3: 275-287 и Kaur and Kanwar (2002), *Drug Develop. Industrial Pharmacy*, vol. 28: 473-493]. Препараты на основе антител против S1P, против ЛФК или против других биоактивных липидов могут, вероятно, применяться с любым из указанных подходов, хотя все они обладают определенными понятными преимуществами и недостатками. Капли для местного применения удобны, но вымываются в первую очередь, из-за носослезного оттока, обычно доставляющего менее 5% применяемого лекарственного средства в переднюю часть глаза и даже меньшее количество данной дозы в задний сегмент глазного яблока. Помимо капель спреи предоставляют другой способ местного применения. Третьим способом являются офтальмические мази или эмульсии, которые могут применяться для увеличения времени контакта композиции с поверхностью глаза, хотя помутнение зрения и матирование век могут причинять беспокойство. Такие терапевтические подходы до сих пор являются предпочтительными, поскольку системное введение препаратов для лечения глазных нарушений подвергает весь организм возможному токсическому действию лекарственного средства.

Лечение заднего сегмента глаза является важным с медицинской точки зрения, поскольку возрастная макулярная дегенерация, диабетическая ретинопатия, задний увеит и глаукома являются основными причинами потери зрения в Соединенных Штатах Америки и других развитых странах [Myles et al. (2005), *Adv. Drug Deliv. Rev.*; 57: 2063-79]. Наиболее эффективным способом доставки лекарственного средства в задний сегмент является интравитреальная инъекция через pars plana. Однако непосредственное проведение инъекции требует квалифицированного врача для того, чтобы осуществить введение, и может вызвать затрудняющую лечение боязнь у многих пациентов. Окологлазные инъекции, подход, который включает субконъюнктивную, ретробульбарную, перibuльбарную и заднюю субтеноновую инъекции, являются несколько менее инвазивными, чем интравитреальные инъекции. Повторяющиеся и продолжительные интравитреальные инъекции могут вызвать осложнения, такие как кровотечение стекловидного тела, отслоение сетчатки или эндофтальмит.

Препарат на основе антитела против биоактивного липида можно также вводить, применяя одну из современных систем глазной доставки [Sultana et al. (2006), *Current Drug Delivery*, vol. 3: 207-217 и Ghate and Edelhauser (2006), *Expert Opinion*, vol. 3: 275-287], включая системы пролонгируемого или контролируемого высвобождения, такие как (a) глазные вставки (растворимые, размываемые, неразмываемые или основанные на гидрогеле), роговичные накладки, например коллагеновый биндаж и контактные линзы, которые обеспечивают контролируемую доставку лекарственного средства в глаз, (b) *in situ* гелеобразующие системы, которые обеспечивают легкое введение в виде капель, которые превращаются в гель в глазу, посредством чего обеспечивается определенное пролонгированное воздействие препарата в глазу, (c) везикулярные системы, такие как липосомы, ниосомы/дискомы и т.д., которые предлагают преимущества целевой доставки, биологическую совместимость и отсутствие помутнения зрения, (d) мукоадгезивные системы, которые лучше задерживаются в глазу, (e) пролекарства, (f) вещества, способствующие проникновению, (g) системы с лиофилизированным носителем, (h) аэрозоли, (i) субмикронные эмульсии, (j) ионтофорез, (k) дендримеры, (l) микросферы, включая биоадгезивные микросферы, (m) наносферы и другие наночастицы, (n) колласомы и (o) системы доставки лекарственного средства, которые являются комбинацией одной или более из вышеуказанных систем, для того, чтобы обеспечить аддитивный или даже синергический положительный эффект. Большинство из этих подходов направлены на передний сегмент глаза и могут быть полезны для лечения заболевания переднего сегмента. Однако один или несколько из указанных подходов могут еще оказаться полезны, воздействуя на концентрацию биоактивных липидов в задней части глаза, потому что относительно низкий молекулярный вес липидов будет, вероятно, делать возможным значительное движение липидов в глазу. Кроме того, антитело, введенное в переднюю часть глаза, может оказаться способным мигрировать сквозь глаз, особенно, если оно произведено в виде модификации антитела с низким весом, такого как Fab-фрагмент. Также могут применяться системы пролонгированной доставки лекарственного средства в задний сегмент, такие как одобренные или разрабатываемые системы (см. ссылки выше).

Как отмечалось раньше, лечение заболевания задней ретины, сосудистой оболочки и макулы явля-

ется важным с медицинской точки зрения. В этом отношении транссклеральный ионтофорез [Eljarrat-Binstock and Domb (2006), *Control Release*, 110: 479-89] представляет собой существенное продвижение вперед и может предложить эффективный способ доставки антител в задний сегмент глаза.

Также в разрабатываемое антитело могут быть добавлены различные эксципиенты, для того чтобы увеличить эффективность лечения, сделать лечение более удобным или быть твердо уверенными, что разрабатываемое антитело применяется только в тех целях, для которых оно предназначено и которые были одобрены. Примеры эксципиентов включают химические средства для контроля pH, антимикробные средства, консерванты для предотвращения потери активности антитела, красители для идентификации композиции только для глазного применения, солубилизирующие средства для увеличения концентрации антитела в композиции, вещества, способствующие проникновению, и применение средств для корректирования изотоничности и/или вязкости. Могут быть добавлены ингибиторы, например, протеаз, чтобы увеличить период полужизни антитела. В одном варианте осуществления антитело доставляют в глаз при помощи интравитреальной инъекции в раствор, содержащем фосфатный буферный солевой раствор с подходящим для глаза pH.

Антитело также может быть химически модифицировано, для того чтобы получить пролекарство, которое вводят с помощью одной из композиций или приспособлений, описанных выше. Активная форма антитела затем высвобождается благодаря действию эндогенного фермента. Возможными глазными ферментами, рассматриваемыми в настоящей заявке, являются разнообразные цитохромы р450, альдегидредуктазы, кетонредуктазы, эстеразы или N-ацетил-β-глюкозамидазы. Другие химические модификации антитела могут увеличивать его молекулярный вес, и, в результате, увеличивать время удерживания антитела в глазу. Примером такой химической модификации является пегилизация [Harris and Chess (2003), *Nat. Rev. Drug Discov.*; 2: 214-21], процесс, который может быть общим или специфическим к функциональной группе, такой как дисульфидная [Shaunak et al. (2006), *Nat. Chem. Biol.*; 2: 312-3] или тиольная [Doherty et al. (2005), *Bioconjug. Chem.*; 16: 1291-8].

Примеры

Настоящее изобретение далее будет описано со ссылкой на нижеследующие подробные примеры. Указанные примеры никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Для получения описанных ниже результатов исследования *in vitro* проводили трехкратно и повторяли по меньшей мере три раза, а исследования *in vivo* проводили по меньшей мере на 5 мышах. Во всех исследованиях проводили статистический анализ, применяя критерий Стьюдента или дисперсионный анализ, с помощью программного обеспечения GraphPad. Там, где это применимо, данные представлены в виде среднего значения $\pm$ СОС (стандартная ошибка среднего) с * обозначающей $p < 0,05$.

Пример 1. Сфингомаб значительно уменьшает ХНВ и образование рубца на модели ХНВ на мышах.

Самки мышей C57BL6/J подвергались индуцированному лазером разрыву оболочки Бруха, и им вводили 0,5 мкг или сфингомаб, или неспецифического (NS) антитела с совпадающим изотипом, разведенных в 2 мкл физиологического солевого раствора. Мышей забивали через 14 и 28 дней после лазерной обработки.

Для индуцирования ХНВ повреждений зрачки расширяли с помощью офтальмического тропикамида (0,5%) и фенилэфрина (2,5%). На глаз помещали покровное стекло. Oculight GL 532 нм (Iridex Corporation, Mountain View, CA), сопряженный с щелевой лампой, установленной, чтобы передать 100-мс импульс при 150 мВ с размером пятна 50 мкм, применяли, чтобы разорвать оболочку Бруха в трех секторах правого глаза, расположенных приблизительно в 50 мкм от диска зрительного нерва в положениях, соответствующих 9, 12 и 3 ч. Левый глаз оставляли в качестве неповрежденного контроля во всех случаях. Все повреждения, не связанные с пузырьками пара, или повреждения, которые стали сливаться, исключали из анализа.

Для измерения размера ХНВ повреждения получали хориоидальные плоские срезы комплекса склеры, сосудистой оболочки глаза и РПЭ и окрашивали их для наблюдения за сосудистой системой (R. communis агглютинин I; красный) и перицитами (CD140b; зеленый). Цифровые снимки получали с помощью эпифлуоресцентной цифровой камеры высокого разрешения Zeiss Axioplan 2 с RGB Spot и лазерного сканирующего конфокального микроскопа (BioRad MRC 1024, BioRad Corporation, Temecula, CA). Для волюметрического анализа применяли получение z-серии и умножали сумму площадей повреждений во всей z-серии на толщину z (4 мкм), чтобы получить объем повреждения.

Чтобы определить отложение коллагена, комплекс склеры, сосудистой оболочки глаза и РПЭ окрашивали трихромом по Массону. Комплекс склеры, сосудистой оболочки глаза и РПЭ заключали в парафин и затем делали серию срезов толщиной 6 мкм. Было исследовано приблизительно по 30 срезов на повреждение. Количественное определение объема отложений коллагена проводили таким же способом, как описано для объема ХНВ повреждения.

Полученные цифровые изображения морфометрически оценивали с помощью программного обеспечения ImageJ (Research Services Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Фиг. 1А показывает, что сфингомаб существенно уменьшает хориоидальную неоваскуляризацию через 14 и 28 дней после

индуцированного лазером разрыва оболочки Бруха. Фиг. 1В показывает, что сфингомаб значительно уменьшает фиброз, связанный с образованием ХНВ повреждения, через 28 дней после индуцированного лазером разрыва оболочки Бруха.

Пример 2. Сфингомаб ингибирует неоваскуляризацию посредством различных механизмов, включая ингибирование миграции эндотелиальных клеток и образования сосудов.

S1P способствует миграции эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) и в анализе на матрикеле и других образованию новых КС *in vitro* [112]; сфингомаб может нейтрализовать указанные эффекты S1P. Эксперименты проводили, как описали Visentin et al. (Cancer Cell 2006 Mar.; 9(3): 225-38). Данные на фиг. 2А позволяют предположить, что HUVEC, посеянные на матрикеле, лишённом ФР, образуют множественные капиллярноподобные структуры в присутствии S1P и не образуют капиллярноподобных структур в отсутствие S1P или при одновременной инкубации с сфингомабом и S1P. Данные на фиг. 2В демонстрируют сильную способность 0,1-1 мкМ S1P стимулировать миграцию HUVEC в 2-2,5 раза по сравнению с необработанными HUVEC, или HUVEC, одновременно инкубированными с сфингомабом, в хемоинвазивном анализе на матрикеле. Вместе данные исследования демонстрируют, что сфингомаб может эффективно ослаблять проангиогенное воздействие S1P на ЭК.

Пример 3. Сфингомаб ингибирует неоваскуляризацию посредством различных механизмов, включая ослабление действия S1P, VEGF и bFGF *in vivo*.

На основании исследований *in vivo*, показывающих, что S1P увеличивает рост эндотелиальных капилляров в подкожных имплантатах матрикеля [54], авторы предположили, что сфингомаб может уменьшать образование новых КС *in vivo*. Чтобы проверить данное предположение, авторы применили *in vivo* анализ с имплантатами матрикеля для изучения неоваскуляризации. В одной серии экспериментов матрикель дополняли или 1 мкМ S1P, 0,5 мкг/мл bFGF, или 1 мкг/мл VEGF и затем вводили мышам интраперитонеально (n=4). Через 10 дней мышей гепаринизировали и вводили им флуоресцентный лектин, изолектин В4-FITC, который связывается с адгезионными молекулами, экспрессируемыми сосудистыми ЭК, которые образуют растущие КС. Затем имплантаты удаляли, замораживали в OCT, делали срезы и наблюдали КС, окрашенные FITC. Данные на фиг. 3А показывают, что S1P является более мощным стимулятором неоваскуляризации *in vivo*, чем bFGF или VEGF [Lee, et al., (1999), Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 264: 743-50], что доказывает значительное количество окрашенных FITC КС в имплантатах, содержащих S1P, по сравнению с имплантатами, содержащими bFGF или VEGF.

Затем срезы имплантатов окрашивали гематоксилином и эозином для определения инфильтрации ЭК (фиг. 3В). Инфильтрация ЭК представляет собой решающую стадию неоваскуляризации. Имплантаты, содержащие S1P, демонстрировали 3-кратное увеличение инфильтрации ЭК по сравнению с имплантатами с одним матрикелем. Предполагается, что клеточная инфильтрация представляет собой инфильтрацию ЭК, хотя авторы понимают, что клетки других типов, такие как иммунные клетки, также могут быть окрашены. Мыши, которым системно вводили сфингомаб каждые 48 ч (начиная за 1 день до имплантации), демонстрировали понижение инфильтрации ЭК, даже когда в имплантаты матрикеля добавляли S1P. Данные результаты демонстрируют способность сфингомаб ингибировать инфильтрацию ЭК *in vivo*.

Эндогенный S1P из крови и окружающей ткани может давать проангиогенный импульс на рану. Исследовали способность сфингомаб ослаблять эндогенный S1P в ране. Мышам вводили оптимально стимулированные имплантаты (матрикель, дополненный 0,5 мкг/мл bFGF или 10 мг/мл VEGF). Мыши получали интраперитонеальные инъекции 25 мг/кг сфингомаб или солевого раствора каждые 48 ч, начиная за 1 день до имплантации матрикеля. Каждая из обработанных групп (матрикель, матрикель с ФР или матрикель с ФР и введение сфингомаба) состояла как минимум из 6 мышей. Через 10 дней мышей подвергали воздействию гепарина, вводили им изолектин В4-FITC, имплантаты вырезали, заключали в среду для замораживания OCT и делали срезы. Микрососудистую плотность определяли количественно при помощи окрашенных лектином-FITC сосудов, как показано на фиг. 3С. Окрашивание КС было спорадическим в контрольных (необработанных) имплантатах, тогда как имплантаты, содержащие bFGF или VEGF, продемонстрировали значительные данные в пользу васкуляризации. Имплантаты из мышей, подвергавшихся воздействию сфингомаба, демонстрировали значительное уменьшение образования КС по сравнению с имплантатами с bFGF или VEGF из мышей, подвергавшихся воздействию солевого раствора. Количественный анализ окрашенных сосудов показал уменьшение неоваскуляризации от 5 до 8,5 раз в имплантатах, содержащих VEGF или bFGF, соответственно животных, подвергавшихся воздействию сфингомаба, по сравнению с животными, подвергавшимися воздействию солевого раствора (фиг. 3С). Кроме того, данный анализ демонстрирует способность эндогенного сывороточного и тканевого S1P усиливать микроваскуляризацию, а также способность сфингомаба нейтрализовывать проангиогенное воздействие эндогенного S1P.

Пример 4. Сфингомаб ингибирует образование рубца *in vivo*.

S1P вносит значительный вклад в заживление ран посредством активирования миграции и пролиферации фибробластов и производства ими коллагена; сфингомаб нейтрализует данный эффект. Несколько исследований различных типов фибробластов подтвердили способность S1P стимулировать заживление ран: 1) S1P увеличивал пролиферацию фибробластов Swiss-3T3, измеренную при помощи вне-

дрения ^3H -тимидина стандартными способами (фиг. 4A); 2) S1P способствовал миграции кардиальных фибробластов в стандартном анализе заживления шрамов (фиг. 4B); 3) S1P способствовал экспрессии коллагена кардиальными фибробластами, выделенными из трансгенных мышей, несущих коллагеновый 1a GFP репортер, что показано при помощи иммуофлуоресцентной микроскопии (фиг. 4C); и 4) S1P индуцировал дифференциацию легочных фибробластов WI-38 в миофибробласты, клетки, которые активны в ремоделировании рубцов, что показывает увеличение экспрессии маркерного белка миофибробластов, α -гладкомышечного актина, при помощи иммуоблот-анализа (фиг. 4D). В каждом из указанных анализов сфингомаб нейтрализовал S1P. Ожидается, что глазные фибробласты будут реагировать на S1P и сфингомаб аналогично. Были отмечены общие черты сердечно-сосудистого заболевания и неоваскулярных повреждений при ВМД, включая ремоделирование рубца и последующее неадаптивное образование фиброзной ткани; [Vine et al. (2005), *Ophthalmology*, vol. 112: 2076-80 и Seddon and Chen (2004), *Int. Ophthalmol. Clin.*, vol. 44: 17-39]; следовательно, можно полагать, что сфингомаб будет оказывать на глазную неоваскуляризацию и рубцевание воздействие, схожее с тем, которое он демонстрировал в сердечно-сосудистых системах. Исследования в Lpath определяли эффективность сфингомаба в уменьшении образования кардиального рубца после необратимого инфаркта миокарда (ИМ) посредством лигирования левой нисходящей коронарной артерии у мышей. Системное применение 25 мг/кг сфингомаба или солевого раствора начинали через 48 ч после оперативного вмешательства. Применение антитела через 48 ч выбрали, чтобы могло происходить нормальное репаративное образование рубца во время ранней фазы ремоделирования и чтобы допустить благотворный, стимулируемый S1P ангиогенез непосредственно после ИМ. Через две недели после инфаркта мышей забивали и определяли фиброз путем окрашивания сердечной ткани трихромом по Массону. Животные, подвергавшиеся воздействию сфингомаба, демонстрировали почти полное исчезновение периваскулярного фиброза (фиг. 4E). В качестве контроля любых неспецифических реакций заживления ран контрольные животные подвергались торакотомии без лигирования коронарной артерии.

Пример 5. S1P способствует трансформации глазных эпителиальных клеток и фибробластов в сократительные миофибробласты, продуцирующие рубцовую ткань.

Патологический фиброз ткани (образование рубца) является первичным фактором, вносящим свой вклад в ряде глазных нарушений, включая возрастную макулярную дегенерацию, диабетическую ретинопатию, ретинопатию недоношенных, пролиферативную витреоретинопатию и последствия хирургии глаукомы.

Во многих из указанных нарушений циркулирующие факторы роста и хемокины способствуют трансформации нормальных глазных клеток в клетки, сокращающие волокна и продуцирующие рубцовую ткань, которые получили название "миофибробласты". Обычно миофибробласты отвечают за восстановление ткани, как части реакции заживления ран, следующей за повреждением. Однако изменения в количестве и функции миофибробластов вовлечены в заболевания, характеризующиеся патологическим образованием рубцовой ткани в печени, коже, легком, почках, сердце и глазах. В глазу трансформация клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) в миофибробластный фенотип связана с образованием стягивающих мембран, которые вызывают отслоение сетчатки и последующее ухудшение зрения. Кроме того, миофибробластная трансформация глазных фибробластов может приводить к патологическому образованию рубцовой ткани после повреждения глаза, что ведет к последующей потере зрения. Хотя многие из циркулирующих белковых факторов в глазу, которые способствуют образованию миофибробластов, были идентифицированы, ничего не известно касательно роли лизолипидов, таких как S1P, в данном процессе. Поэтому авторы исследовали воздействие S1P на миофибробластную трансформацию нескольких линий глазных клеток человека. Как показано на фиг. 5, S1P стимулирует производство α -гладкомышечного актина (α -ГМА; маркер миофибробластов) в клетках ретинального пигментного эпителия человека (фиг. 5A) и фибробластах конъюнктивы человека (фиг. 5B). Указанные данные демонстрируют впервые, что S1P входит в число циркулирующих химических факторов, которые способствуют трансформации глазных эпителиальных клеток и фибробластов в сократительные, продуцирующие рубцовую ткань миофибробласты, которые могут вносить вклад в отслоение сетчатки, глазной фиброз и последующее ухудшение зрения.

В указанных экспериментах способность S1P стимулировать экспрессию α -ГМА различалась зависящим от концентрации образом между клетками ретинального пигментного эпителия и фибробластами конъюнктивы. Как показано, значительное увеличение экспрессии α -ГМА наблюдается при концентрации 0,001 мкМ в эпителиальных клетках, которое затем уменьшается до базального уровня при концентрации 10 мкМ. Напротив, значительное увеличение экспрессии α -ГМА в фибробластах конъюнктивы наблюдается только при концентрации 10 мкМ. Как полагают, указанная разница является результатом увеличенной экспрессии рецептора S1P в эпителиальных клетках по сравнению с фибробластами. Авторы предположили, что по причине увеличенного уровня экспрессии рецептора S1P клетки ретинального пигментного эпителия, вероятно, являются более чувствительными к S1P при низких концентрациях. Напротив, при высоком уровне S1P рецепторы становятся сенситизированными или, возможно, даже интернализированными, что ведет к уменьшению стимуляции посредством S1P.

Коллаген представляет собой один из первичных структурных белков, которые поддерживают все ткани в организме, и является одним из главных компонентов рубцовой ткани. В непатологических условиях общее содержание коллагена в ткани поддерживается посредством баланса между производством коллагена фибробластами и деградации определенными ферментами. Ряд нарушений, которые влекут за собой увеличение количества рубцовой ткани, частично является результатом физиологических и молекулярных процессов, которые ингибируют деградацию коллагена, которая необходима для образования рубца. Авторы предположили, что способность S1P стимулировать образование рубцовой ткани может быть результатом его способности ингибировать деградацию коллагена, тем самым вызывая общее увеличение количества рубцовой ткани в органах. Поэтому авторы исследовали воздействие S1P на экспрессию ингибитора активатора плазминогена (ИАП-1) в фибробластах конъюнктивы человека. Увеличивающаяся экспрессия ИАП-1 находится в связи с уменьшением протеолитической деградации соединительной ткани и активируется в связи с несколькими фиброзными заболеваниями, которые влекут за собой увеличенное рубцевание. Как показано на фиг. 5C, S1P стимулирует экспрессию ИАП-1 зависимым от дозирования образом. Указанные данные означают, что можно также способствовать образованию рубцовой ткани посредством стимулирования экспрессии белков, которые ингибируют ее разрушение, позволяя предположить, что S1P осуществляет свои функции посредством путей с различными механизмами стимулирования и поддержания патологического рубцевания, связанного с глазными болезнями.

Пример 6. Сфингомаб ингибирует воспалительную и иммунную инфильтрацию клеток.

Воспаление является первой реакцией в процессе ремоделирования [7]. Оно вызывается как ишемией, так и повреждением клеток и приводит к увеличению экспрессии цитокинов, которая стимулирует миграцию макрофагов и нейтрофилов в поврежденную область для фагоцитоза мертвых клеток и для дальнейшего усиления воспалительной реакции [Jordan et al. (1999), *Cardiovasc. Res.*, vol. 43: 860-78]. Тучные клетки также являются важными клеточными медиаторами воспалительной реакции. Выбрасываемый тучными клетками S1P отвечает за многие из побочных реакций, наблюдаемых в экспериментальных моделях воспаления на животных [Jolly et al. (2004), *J. Exp. Med.*, vol. 199: 959-70 и Jolly et al. (2005), *Blood*, vol. 105: 4736-42].

Исходя из сходства иммунной и воспалительной реакций при ХНБ и ССЗ (сердечно-сосудистое заболевание), определяли эффективность сфингомаба в ослаблении иммунной клеточной инфильтрации в рану в модели инфаркта на мышах в качестве критерия возможности эффекта уменьшения указанных повреждений с помощью сфингомаба во время ВМД [Vine et al. (2005), *Ophthalmology*, vol. 112: 2076-80 и Seddon and Chen (2004), *Int. Ophthalmol. Clin.*, vol. 44: 17-39]. Через четыре дня после ИМ определяли инфильтрацию макрофагов и тучных клеток при помощи антител MAC-1 и MCG35 соответственно в области риска. Сфингомаб существенно снижал плотность макрофагов воспаления (фиг. 6A) и тучных клеток (фиг. 6B), позволяя предположить, что сфингомаб может нейтрализовать иммунные и воспалительные повреждения во время ВМД.

Пример 7. Сфингомаб высокоспецифичен к S1P.

Конкурентный ELISA показывает специфичность сфингомаба к S1P по сравнению с другими биоактивными липидами. Сфингомаб не демонстрирует перекрестной реактивности со сфингозином (SPH), непосредственным метаболическим предшественником S1P, или лизофосфатидной кислотой (ЛФК), важной молекулой внеклеточной сигнализации, которая структурно и функционально похожа на S1P. Сфингомаб не распознает другие похожие структурно липиды и метаболиты, включая церамид-1-фосфат (C1P), дигидросфингозин (DH-SPH), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилэтаноламин (ФЭ) или сфингомиелин (СМ). Сфингомаб перекрестно реагирует с дигидросфингозин-1-фосфатом (DH-S1P) и, в меньшей степени, сфингозилфосфорилхолином (СПК) (фиг. 7).

Пример 8. Разработка mAb против ЛФК.

Общей целью данных экспериментов является создать и разработать mAb, специфические к ЛФК, для развития основанной на антителах терапии для лечения связанных с ЛФК заболеваний, в особенности тех заболеваний, которые могут вызывать избыточный фиброз. Например, ЛФК может обладать определенным прямым фиброгенным действием посредством стимулирования экспрессии гена коллагена и пролиферации фибробластов [Chen, et al. (2006) *FEBS Lett.* 580(19): 4737-45]. Следовательно, mAb против ЛФК может оказаться полезным в лечении фиброза и заболеваний, характеризующихся избыточной активностью фибробласта. Данные заболевания включают, без ограничения, различные глазные нарушения, кардиальное ремоделирование, сердечную недостаточность и склеродермию. Антитела, направленные против биоактивного липида, ЛФК, которые демонстрируют хорошие характеристики эффективности как в анализе *in vitro*, так и *in vivo*, могут быть очень полезны для терапевтических и диагностических применений.

Для того чтобы создать моноклональные антитела (mAb) против ЛФК, 80 мышей были иммунизированы производным лизофосфатидной кислоты (ЛФК, 1-ацил-2-лизо-sn-глицеро-3-фосфат). Наличие антител против ЛФК определяли при помощи анализа сывороток иммунизированных мышей с помощью ELISA через 3 момента времени после иммунизации. Иммунная реакция сильно различалась между отдельными мышами, по отношению как к времени реакции антитела, так и достигнутому уровню. В основном значительная иммунологическая реакция (титр >125000) наблюдалась, по меньшей мере, у поло-

вины мышей. Пять мышей с наивысшим титром антитела выбрали для того, чтобы начать развитие гибридной клеточной линии. После первоначального скрининга более 2000 клеток гибридомы, образовавшихся от указанных 5 слияний, всего 29 гибридных клеточных линий, секретирующих антитела против ЛФК, демонстрировали связывание с ЛФК. Из указанных клонов 24 субклонировали дальше и охарактеризовали на панели для анализа ELISA. Из 14 клонов, показавших положительный результат, шесть клонов выбрали для дальнейшего исследования. Изотип mAb оказался IgG1 для большинства антител.

При первоначальном скрининге провели сравнение связывающих свойств всех mAb с 12:0 ЛФК и S1P. Из 26 mAb 5 клонов перекрестно реагировали с S1P. Восемь mAb против ЛФК с наилучшим связыванием с 12:0 и 18:0 ЛФК в дальнейшем подвергли исследованию их специфичности и связывающих свойств.

Специфичность mAb от 6 отдельных клеточных линий была полностью исследована в конкурентном ELISA с помощью серии аналогов, а их активность с помощью панели *in vitro* анализа (табл. 1). Большинство из mAb демонстрировали специфичность к изоформам ЛФК. Аффинность антител была определена в пикомолярном диапазоне. Дальнейшее исследование с помощью моделей на животных определит, могут ли данные mAb предоставить основу для перспективной терапии заболеваний, связанных с ЛФК.

При помощи поверхностного плазмонного резонанса измерили аффинность и кинетические параметры для 6 mAb (табл. 2). Все шесть mAb связывались с ЛФК с близкими значениями K_D (в диапазоне от 0,34 до 3,8 нМ) и близкими кинетическими параметрами. Для многих из этих взаимодействий была зафиксирована k_d , равная $1 \times 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ в программе для подгонки, поскольку диссоциация комплексов происходила очень медленно. Табл. 1 также иллюстрирует связывание указанных 6 mAb с 18:0 и 12:0 ЛФК, связанных с лунками планшета для ELISA при возрастании концентрации. Концентрацию mAb, представляющую собой 50% эффективной концентрации (EC_{50}) и максимальное связывание (МС), определяли при помощи 18:0 и 12:0 ЛФК в качестве покрывающего антигена. Значения EC_{50} обычно оказывались меньше для 18:0 ЛФК. Было отмечено, что mAb B3 демонстрировал более высокий уровень связывания с 18:0 ЛФК, чем с 12:0 ЛФК, по сравнению с другими mAb.

Специфичность mAb против ЛФК измеряли путем определения связывания с рядом модификаций ЛФК и родственных биоллипидов, таких как дистеароилфосфатидная кислота, лизофосфатидилхолин, S1P, церамид и церамид-1-фосфат. IC_{50} и перекрестная реактивность 6 выбранных mAb и двух дополнительных mAb (504B58-3F8 и 504B104), направленных против разных родственных ЛФК соединений, приведены в табл. 3. Все mAb различали между 12:0 (лауроил), 14:0 (миристоил), 16:0 (пальмитоил), 18:1 (олеоил), 18:2 (линолеоил) и 20:4 (арахидоноил) ЛФК (табл. 3), тогда как ни одно из них не продемонстрировало перекрестной реактивности к дистеароил-ФК и -ЛФХ, непосредственному метаболическому предшественнику ЛФК. Более того, ингибирующий эффект других исследованных липидов, таких как S1P, церамид и церамид-1-фосфат, оказался пренебрежимо мал. Данные результаты ясно показывают, что mAb против ЛФК не распознает такие структурно близкие липиды, включая липиды-предшественники, демонстрируя высокую специфичность антител к лизофосфатидным кислотам. Порядок по величине EC_{50} оказался для ненасыщенных липидов 18:2>18:1>20:4, а для насыщенных 14:0>16:0>18:0.

Что интересно, конкуренция с 18:1 ЛФК показала различное поведение у 6 mAb. Среди 6 mAb 504B3 демонстрировало наименьшую IC_{50} (50% ингибирования связывания). Прямое связывание mAb 504B3 с иммобилизованной 18:1 ЛФК эффективно блокировалось в присутствии добавленной 18:1 ЛФК со значением IC_{50} 287 нМ. Неожиданно, ни одно из значений IC_{50} не оказалось близким к их относительным величинам K_d для связывания с ЛФК. Значение IC_{50} было по меньшей мере в 100 раз выше, чем их K_d (наномолярный диапазон против пикомолярного). 5 mAb демонстрировали специфичность к 18:1 ЛФК, как показано в конкурентном анализе. 18:1 ЛФК не конкурировала со связыванием mAb 63 с иммобилизованной 18:1 ЛФК, более того, оно связывало ЛФК со значением K_d в пикомолярном диапазоне. Таким образом, притом, что все шесть mAb связывались с ЛФК с близкими аффинностями, пять из шести mAb демонстрировали эффективное и специфическое связывание с 18:1 ЛФК.

В табл. 1 исследовали возрастающие количества mAb (вплоть до 40 нг/100 мкл реакционной смеси) на связывание с 12:0 ЛФК или 18:0 ЛФК (0,1 мкМ) в качестве покрывающего антигена.

Таблица 1

Кинетика прямого связывания

	ЛФК-С12							
	B3	B7	B58	B58-3F8	B104	D22-1	A63-1	B3A6-1
HMC (нМ)	2,420	0,413	0,554	0,463	0,559	1,307	0,280	0,344
Max (OD450)	0,809	1,395	1,352	1,404	1,402	0,449	1,269	1,316
	ЛФК-С18							
	B3	B7	B58	B58-3F8	B104	D22-1	A63-1	B3A6-1
HMC (нМ)	1,067	0,274	0,245	0,187	0,313	0,176	0,298	0,469
Max (OD450)	1,264	0,973	0,847	1,000	1,016	0,353	1,302	1,027

EC₅₀: эффективная концентрация антитела, при которой происходит 50% от максимального связывания.

MC: максимальное связывание (выраженное как OD450).

В табл. 2 показано, что ЛФК была иммобилизована на сенсорном чипе в диапазоне плотности 150 резонансных единиц. Растворы каждого mAb пропускали над иммобилизованной ЛФК и получали кинетические константы с помощью нелинейной регрессии фаз ассоциации/диссоциации. Ошибки получали в виде стандартного отклонения, используя по меньшей мере три исследования параллельно. Наблюдаемую аффинность определяли как $K_D = k_d/k_a$.

Таблица 2

Аффинность связывания мышиных mAb против ЛФК

Молекулы антител	k_a (M ⁻¹ c ⁻¹)	k_d (c ⁻¹)	K_D (нМ)
A63	$4,4 \pm 1,0 \times 10^5$	1×10^{-6}	$2,3 \pm 0,5$
B3	$7,0 \pm 1,6 \times 10^5$	1×10^{-6}	$1,4 \pm 0,3$
B7	$6,2 \pm 0,1 \times 10^5$	1×10^{-6}	$1,6 \pm 0,1$
D22	$3,0 \pm 0,9 \times 10^4$	1×10^{-6}	33 ± 10
B3A6	$1,2 \pm 0,9 \times 10^6$	$1,9 \pm 0,4 \times 10^{-6}$	$16 \pm 1,2$
B58	$2,9 \pm 1,6 \times 10^5$	1×10^{-6}	$0,34 \pm 0,019$

k_a - Константа скорости ассоциации, M⁻¹ c⁻¹.

k_d - Константа скорости диссоциации, c⁻¹.

В табл. 3 18:0 ЛФК помещали на планшеты для ELISA. Каждый конкурирующий липид (вплоть до 10 мкМ) последовательно разбавляли в БСА (1 мг/мл)-ФСБ и затем инкубировали с mAb (3 нМ). Затем смеси переносили в покрытые ЛФК лунки и измеряли количество связавшегося антитела с помощью второго антитела. Данные нормализовали до максимального сигнала (A₄₅₀) и выразили в процентах ингибирования. Исследования проводили трижды для анализа параметров.

Таблица 3

Конкуренция связывания и активности ЛФК

	14:0 ЛФК		16:0 ЛФК		18:1 ЛФК		18:2 ЛФК		20:4 ЛФК	
	IC ₅₀	МИ	IC ₅₀	МИ	IC ₅₀	МИ	IC ₅₀	МИ	IC ₅₀	МИ
	мкМ	%	мкМ	%	мкМ	%	мкМ	%	мкМ	%
504B3	0,02	72,3	0,05	70,3	0,287	83	0,064	72,5	0,02	67,1
504B7	0,105	61,3	0,483	62,9	>2,0	100	1,487	100	0,161	67
504B58	0,179	66,7	3,061	>100	1,606	72,8	1,278	94,6	0,22	63,6
504B58-3F8	0,26	63,9	5,698	>100	1,5	79,3	1,240	92,6	0,304	79,8
504B104	0,32	23,1	1,557	26,5	28,648	>100	1,591	36	0,32	20,1
504D22-1	0,164	34,9	0,543	31	1,489	47,7	0,331	31,4	0,164	29,5
504A63-1	1,147	31,9	5,994	45,7	---	---	---	---	0,119	14,5
504B3A6-1	0,108	59,9	1,151	81,1	1,897	87,6	---	---	0,131	44,9

IC₅₀: концентрация, при которой ингибирование составляет половину от максимального.

МИ: максимальное ингибирование (% от связывания в отсутствие ингибитора).

---: не определено из-за слабого ингибирования.

Материалы и методы.

Биолипидные средства.

Все биолипиды были приобретены у Avanti Polar Lipids, и их идентичность проверялась при помощи ВЭЖХ и масс-спектрометрии.

Производные ЛФК были синтезированы в Department of Chemistry (San Diego State University). Все остальные реагенты были приобретены у Fisher, если не оговорено иное.

DLPC: 1-пальмитоил-2-миристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин,

DASA: 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфат,

14:0 ЛФК: 1-миристоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфат,

16:0 ЛФК: 1-пальмитоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфат,

18:0 ЛФК: 1-стеароил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфат,

18:1 ЛФК: 1-олеоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфат,

18:2 ЛФК: 1-линолеоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфат,

20:4 ЛФК: 1-арахидоноил-2-гидроксн-sn-глицеро-3-фосфат,

S1P: D-эритросфингозин-1-фосфат.

Количественные ELISA.

Титрационные микропланшеты для ELISA (Costar, кат. № 3361) покрывали кроличьим антителом против мышинных IgG, специфичным к F(ab')₂-фрагменту (Jackson, 315-005-047), разведенным в 1 М карбонатном буфере (pH 9,5), при 37°C в течение 1 ч. Планшеты промывали ФСБ и блокировали ФСБ/БСА/Tween-20 в течение 1 ч при 37°C. Для начальной инкубации растворы неспецифического мышинового IgG или человеческого IgG, целой молекулы (используемой для калибровочной кривой) и измеряемого образца добавляли в лунки. Планшеты промывали и инкубировали с 100 мкл антитела козла против мыши (H+L), конъюгированного с ПХ, разведенного 1:40000, на лунку (Jackson, кат. № 115-035-146) в течение 1 ч при 37°C. После промывания детектировали ферментативную реакцию с помощью тетраметилбензидина (Sigma, кат. № T0440) и останавливали добавлением 1 М H₂SO₄. Измеряли оптическую плотность (OD) на 450 нм, используя Thermo Multiskan EX. Необработанные данные передавали в программу GraphPad для анализа.

Прямой ELISA.

Титрационные микропланшеты для ELISA (Costar, кат. № 3361) покрывали ЛФК-БСА, разведенным в 1 М карбонатном буфере (pH 9,5), при 37°C в течение 1 ч. Планшеты промывали ФСБ (137 мМ NaCl, 2,68 мМ KCl, 10,1 мМ Na₂HPO₄, 1,76 мМ KH₂PO₄; pH 7,4) и блокировали ФСБ/БСА/Tween-20 в течение 1 ч при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C. Образцы для исследования разводили в концентрации 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,0125 и 0 мкг/мл и добавляли 100 мкл в каждую лунку. Планшеты промывали и инкубировали с 100 мкл антитела козла против мыши, конъюгированного с ПХ, (разведение 1:20000) на лунку (Jackson, кат. № 115-035-003) в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывания детектировали ферментативную реакцию с помощью тетраметилбензидина (Sigma, кат. № T0440) и останавливали добавлением 1 М H₂SO₄. Измеряли оптическую плотность (OD) на 450 нм, используя Thermo Multiskan EX. Необработанные данные передавали в программу GraphPad для анализа.

Конкурентный анализ.

Специфичность mAb исследовали с помощью ELISA анализа. Титрационные микропланшеты для ELISA (Costar, каталожный № 3361) покрывали 18:0 ЛФК-БСА, разведенным в 1 М карбонатном буфере (pH 9,5), при 37°C в течение 1 ч. Планшеты промывали ФСБ (137 мМ NaCl, 2,68 мМ KCl, 10,1 мМ Na₂HPO₄, 1,76 мМ KH₂PO₄; pH 7,4) и блокировали ФСБ/БСА/Tween-20 при 37°C в течение 1 ч или в течение ночи при комнатной температуре. Для начальной инкубации 0,4 мкг/мл mAb против ЛФК и предварительно определенные количества (14:0, 16:0, 18:0, 18:1, 18:2 и 20:4) ЛФК, DSPA, 18:1 ЛФХ (лизофосфатидилхолин), S1P, церамида и церамид-1-фосфата добавляли в лунки планшетов для ELISA и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Планшеты промывали и инкубировали с 100 мкл антитела козла против мыши, конъюгированного с ПХ (разведение 1:20000) (Jackson, кат. № 115-035-003) или античеловеческого антитела козла (H+L), конъюгированного с ПХ, разведенного 1:50000 (Jackson, кат. № 109-035-003) на лунку при 37°C в течение 1 ч. После промывания детектировали ферментативную реакцию с помощью тетраметилбензидина и останавливали добавлением 1 М H₂SO₄. Измеряли оптическую плотность (OD) на 450 нм, используя Thermo Multiskan EX. Необработанные данные передавались в программу GraphPad для анализа.

Очистка антител.

Моноклональные антитела выделяли из культурального супернатанта с помощью пропускания супернатанта через колонки с белком A/G (Pierce, кат. № 53133) при 0,5 мл/мин. Мобильная фаза состояла из связывающего IgG буфера 1X Pierce (кат. № 21001) и 0,1 М глицина pH 2,7 (Pierce, буфер для элюирования, каталожный № 21004). Сборы антител в 0,1 М глицине разбавляли на 10% (об./об.) 1 М фосфатным буфером, pH 8,0, чтобы нейтрализовать pH. Сборы IgG₁ объединяли и подвергали тщательному диализу против 1X ФСБ (Pierce Slide-A-Lyzer Cassette, 3500 MWCO, кат. № 66382). Элюаты концентрировали с помощью Centricon YM-3 (10000 MWCO Amicon каталожный № 4203) центрифугированием в течение 1 ч при 2500 gcf. Концентрации антитела определяли при помощи количественного ELISA, как описано выше, применяя в качестве стандарта коммерческий исходный раствор миеломного IgG₁. Типы тяжелой цепи mAb определяли с помощью ELISA, применяя набор "Monoclonal Antibody Isotyping Kit" (Sigma, ISO-2).

Пример 9. Гуманизированное моноклональное антитело против S1P-сфингомаб.

Данный пример описывает особенно предпочтительное гуманизированное моноклональное антитело, специфически реагирующее с S1P. Конструирование, синтез, очистка и тестирование данного антитела, названного LT1009, описаны в находящейся в общей собственности, совместно рассматриваемой, одновременно внесенной в реестр патентной заявкой США сер. № XX/XXXXXX [номер в реестре патентного поверенного LPT-3010-PV, под заголовком "Compositions and Methods for Binding Sphingosine-1-Phosphate"], которая, таким образом, включена в качестве ссылки в полном объеме. По сравнению с мышинным антителом против S1P, из которого было получено LT1009, гуманизированная форма демонстрирует аффинность связывания S1P в пикомолярном диапазоне, а также лучшую стабильность и эф-

фективность in vivo.

Как и природные антитела, LT1009 включает три участка, определяющих комплементарность (каждый "CDR") в каждом из двух полипептидов легкой цепи и в каждом из двух полипептидов тяжелой цепи, которые входят в каждую молекулу антитела. Аминокислотные последовательности каждого из данных шести CDR приведены непосредственно ниже ("VL" обозначает вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина, тогда как "VH" обозначает вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина):

CDR1 VL: ITTTDIDDDMN [SEQ ID NO: 1],

CDR2 VL: EGNILRP [SEQ ID NO: 2],

CDR3 VL: LQSDNLPFT [SEQ ID NO: 3],

CDR1 VH: DHTIH [SEQ ID NO: 4],

CDR3 VH: GGFYGSTIWFDF [SEQ ID NO: 5],

CDR2 VH: AISPRHDITKYNEMFRG [SEQ ID NO: 6].

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности полипептидов тяжелой и легкой цепи LT1009 приведены непосредственно ниже.

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи LT1009 [SEQ ID NO: 7]

```

1  aagcttgccg ccaccatgga atggagctgg gtgttcctgt tctttctgtc
51  cgtgaccaca ggcggtgcatt ctgaggtgca gctgggtgcag tctggagcag
101 aggtgaaaaa gcccggggag tctctgaaga tctcctgtca gagttttgga
151 tacatcttta tcgaccatac tattcactgg atgcgccaga tggccgggca
201 aggcctggag tggatggggg ctattttctcc cagacatgat attactaaat
251 acaatgagat gttcaggggc caggtcacca tctcagccga caagtccagc
301 agcaccgcct acttgcatg gagcagcctg aaggcctcgg acaccgccat
351 gtattttctgt gcgagagggg ggttctacgg tagtactatc tgggttgact
401 tttggggcca agggacaatg gtcaccgtct ctccagcctc caccaggggc
451 ccacgggtct tccccctggc accctctctc aagagcact ctggggggcac
501 agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccgggtgacgg
551 tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggct
601 gtctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc
651 ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaaac
701 ccagcaaac caaggtggac aagagagttg gtgagaggcc agcacaggga
751 gggaggggtg ctgctggaag ccaggctcag cgtcctgcc tggacgcac
801 ccggctatgc agtcccagtc cagggcagca aggcaggccc cgtctgcctc
851 ttcaaccgga ggcctctgcc cggccactc atgctcaggg agagggtctt
901 ctgggttttt ccccaggctc tgggcaggca caggctaggt gccctaacc
951 caggccctgc acacaaaggg gcagggtctg ggctcagacc tgccaagagc
1001 catatccggg aggaccctgc cctgacctc agccacccc aaaggccaaa
1051 ctctccactc cctcagctcg gacacctctc ctctccagc attccagtaa
1101 ctcccaatct tctctctgca gagcccaaat ctgtgtgaca aactcacaca
1151 tgcccaccgt gccaggttaa gccagcccag gcctcgcct ccagctcaag
1201 gcgggacagg tgccttagag tagcctgcat ccagggacag gccccagccg
1251 ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcacctg aactcctggg
1301 gggaccgtca gtcttctctc tcccccaaa acccaaggac accctcatga
1351 tctcccgga cctgaggtc acatggctgg tgggtggact gagccacgaa
1401 gaccctgagg tcaagttcaa ctggtagctg gacggcgtgg aggtgcataa
1451 tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg
1501 tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac
1551 aagtgcagg tctcaacaa agccctccca gcccccacg agaaaaccat
1601 ctccaaagcc aaaggtggga ccggtgggt gcgagggcca catggacaga
1651 ggccggctcg gccaccctc tgcctgaga gtgaccgtg taccaacctc
1701 tgtccctaca gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat
1751 ccggggagga gatgaccaag aaccaggtca gootgacctg cctgggtcaa
1801 ggctttctat ccagcgacat cgcctgggag tgggagagca atgggcagcc
1851 ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt gctggactcc gacggctcct
1901 tcttctctc tagcaagtc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
1951 aacgtctct catgctcgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac
2001 gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atag

```

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи LT1009 [SEQ ID NO: 8]

```

1  mewswwflff lsvttgvhse vqlvqsgaev kkpgeslkis cqsfgyifid
51  htihwmrgmp gqglewmgai sprhditkyn emfrgqvttis adkssstayl
101 qwselkasdt amyfcarggf ygstiwfdw gqgtmvtvss astkgpsvfp
151 lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsagaltsgv htfpavlgss
201 glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkrvap ellggpsvfl
251 fpkpdkdtlm isrtpevtcv vvdvshedpe vkfnwyvdgv evhnaktkpr
301 eeqynstyrv vsvltvlhqd wlngkeykck vankalpapi ektiskakgq
351 prepvytllp psreemtknq vsltclvkqf ypsdiavewe sngqpennyk
401 ttppvldsdg sfflyskltv dksrwqggnv fscsvmheal hnhytqksls
451 lsgpk

```

Нуклеотидная последовательность легкой цепи LT1009 [SEQ ID NO: 9]

```

1  aagcttgccg ccaccatgtc tgtgcctacc caggtgctgg gactgctgct
51  gctgtggctg acagacgccc gctgtgaaac gacagtgacg cagtctocat
101 ccttcctgtc tgcattctgt ggagacagag tcaccatcac ttgcataacc
151 accactgata ttgatgatga tatgaactgg ttccagcagg aaccagggaa
201 agccoctaag ctctctgatct ccgaaggcaa tattcttcgt cctgggggtcc
251 catcaagatt cagcagcagt ggatatggca cagatttcac tctcaccatc
301 agcaaattgc agcctgaaga ttttgcaact tattactggt tgcagagtga
351 taacttacca ttacttttcg gccaaaggac caagctggag atcaaacgta
401 cgggtggctg accatctgtc ttcattcttc cgcctctga tgagcagttg
451 aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag
501 agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa tcgggtaact
551 ccagggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc
601 agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta
651 cgcctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct
701 tcaacagggg agagtgttag

```

Аминокислотная последовательность легкой цепи LT1009 [SEQ ID NO: 10]

```

1  msvptqvlgl lllwltldarc ettvtqpsf lsasvgdrvt itcittddid
51  ddmnwfgqep gkapklise gnilrpgvps rfsssgygtf ftltisklqp
101 edfatyyclq sdnlpftfgg gtleikrtv aapsvfifpp sdeqlksgta
151 svvcllnnfy preakvqkv dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt
201 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfh rgec

```

Список последовательностей

- <110> LPATH, INC.
- <120> КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ СОСТОЯНИЙ ФИБРОЗА, ВОСПАЛЕНИЯ И НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ
- <130> LPT-3100-PC3
- <140>
- <141>
- <150> 11/261,935
- <151> 2005-10-28
- <160> 10
- <170> PatentIn Ver. 3.3
- <210> 1
- <211> 11
- <212> Белок
- <213> Искусственная последовательность
- <220>
- <223> Описание искусственной последовательности: искусственное гуманизированное мышиное антитело
- <400> 1
- | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Thr | Thr | Thr | Asp | Ile | Asp | Asp | Asp | Met | Asn |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | |
- <210> 2
- <211> 7
- <212> Белок
- <213> Искусственная последовательность
- <220>
- <223> Описание искусственной последовательности: искусственное гуманизированное мышиное антитело
- <400> 2
- | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Gly | Asn | Ile | Leu | Arg | Pro |
| 1 | | | | 5 | | |
- <210> 3
- <211> 9
- <212> Белок
- <213> Искусственная последовательность
- <220>
- <223> Описание искусственной последовательности: искусственное гуманизированное мышиное антитело
- <400> 3
- | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Gln | Ser | Asp | Asn | Leu | Pro | Phe | Thr |
| 1 | | | | 5 | | | | |
- <210> 4
- <211> 5
- <212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: искусственное гуманизированное мышиное антитело

<400> 4

Asp His Thr Ile His
1 5

<210> 5

<211> 12

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: искусственное гуманизированное мышиное антитело

<400> 5

Gly Gly Phe Tyr Gly Ser Thr Ile Trp Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 6

<211> 17

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: искусственное гуманизированное мышиное антитело

<400> 6

Ala Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 2034

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: искусственное гуманизированное мышиное антитело

<400> 7

aagcttgccg ccaccatgga atggagctgg gtgttctgt tctttctgtc cgtgaccaca 60
ggcgtgcatt ctgaggtgca gctgggtgag tctggagcag aggtgaaaaa gcccggggag 120
tctctgaaga tctcctgtca gagttttgga tacatcttta tcgaccatac tattcactgg 180
atgcgccaga tgcccgggca aggcctggag tggatggggg ctatttctcc cagacatgat 240
attactaaat acaatgagat gttcaggggc caggtcacca tctcagccga caagtccagc 300
agcaccgcct acttgacgtg gaggagcctg aaggcctcgg acaccgccat gtatttctgt 360
gcgagagggg gggtctacgg tagtactatc tggtttgact ttgggggcca agggacaatg 420
gtcaccgtct cttcagcctc caccaggggc ccatcggtct tccccctgga accctcctcc 480
aagagcacct ctggggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
ccggtgacgg tgctcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccggt 600
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc cttccagcagc 660
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaaag ccagcaacac caaggtggac 720

```

aagagagttg gtgagaggcc agcacaggga gggaggggtg ctgctggaag ccagggtcag 780
cgctcttgcc tggacgcate ccggctatgc agtcccagtc cagggcagca aggcaggccc 840
cgctctgcctc ttacaccgga ggccctctgcc cgcccactc atgctcaggg agagggtctt 900
ctgggttttt ccccagggtc tgggcaggga caggctaggt gccctaacc caggccctgc 960
acacaaaggg gcagggtgctg ggctcagacc tgccaagagc catatccggg aggaacctgc 1020
ccctgacctc agccccccc aaaggccaaa ctctccactc cctcagctcg gacaccttct 1080
ctctccccc attccagtaa ctcccaatct tctctctgca gagcccaaat cttgtgacaa 1140
aactcacaca tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag gctctgcccct ccagctcaag 1200
gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccagggacag gccccagccg ggtgctgaca 1260
cgccacctc catctcttcc tcagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct 1320
tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga cctcaggtc acatgcgtgg 1380
tggtggacgt gagccagaa gacctgagg tcaagttaa ctggtacgtg gacggcgtgg 1440
aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg agggagcagta caacagcacg taccgtgtgg 1500
tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtag aagtgaagg 1560
tctccaacaa agccctccca gcccctatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggtgga 1620
cccggtgggt gcgagggcca catggacaga gggcggtctg gccaccctc tgccctgaga 1680
gtgaccgctg taccaacctc tgtccctaca gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1740
ctgccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggtag cctgacctg cctggtcaaa 1800
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1860
tacaagacca cgctccctg gctggactcc gacggctcct tcttctctta tagcaagctc 1920
accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1980
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atag 2034

```

<210> 8
 <211> 455
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: искусственное гуманизованное мышиное антитело

<400> 8
 Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15

 Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

 Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Gln Ser Phe Gly Tyr Ile Phe
 35 40 45

 Ile Asp His Thr Ile His Trp Met Arg Gln Met Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

 Glu Trp Met Gly Ala Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn
 65 70 75 80

 Glu Met Phe Arg Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

 Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
 100 105 110

 Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Phe Tyr Gly Ser Thr Ile Trp Phe Asp
 115 120 125

 Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Ala Pro
 225 230 235 240
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 9
 <211> 720
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> Описание искусственной последовательности: искусственное гуманизированное мышиное антитело

```
<400> 9
aagctgtgccg ccaccatgtc tgtgcctacc caggtgctgg gactgctgct gctgtggctg 60
acagacgccc gctgtgaaac gacagtgcag cagtctccat ccttcctgtc tgcactgtga 120
ggagacagag tcaccatcac ttgcataacc accactgata ttgatgatga tatgaactgg 180
ttccagcagg aaccagggaag agcccoctaag ctccctgatct ccgaaggcaa tattcttcgt 240
cctgggggtcc catcaagatt cagcagcagt ggatatggca cagatttcac tctcaccatc 300
agcaaattgc agcctgaaga ttttgcaact tattactgtt tgcagagtga taacttacca 360
ttcacttttc gccaaagggac caagctggag atcaaacgta cgggtggctgc accatctgtc 420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480
ctgaataact totatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa 540
tcgggtaact ccagggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
agcagcaccg tgacgtctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 660
gtcaccatc agggcctgag ctgcctcgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720
```

<210> 10

<211> 234

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: искусственное гуманизированное мышиное антитело

<400> 10

```
Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr
  1          5          10          15

Asp Ala Arg Cys Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser
  20          25          30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Thr Thr Asp
  35          40          45

Ile Asp Asp Asp Met Asn Trp Phe Gln Gln Glu Pro Gly Lys Ala Pro
  50          55          60

Lys Leu Leu Ile Ser Glu Gly Asn Ile Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser
  65          70          75          80

Arg Phe Ser Ser Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
  85          90          95

Lys Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp
 100          105          110

Asn Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115          120          125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130          135          140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145          150          155          160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165          170          175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180          185          190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195          200          205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210          215          220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225          230
```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ уменьшения или предупреждения aberrантного фиброгенеза, фиброза или рубцевания глаза животного, включающий введение указанному животному выделенного гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с SIP (сфингозин-1-фосфатом) и содержит по меньшей мере один варибельный домен тяжелой цепи и по меньшей мере один варибельный домен легкой цепи, где по меньшей мере один варибельный домен тяжелой цепи содержит последовательность аминокислотных остатков AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 6) и где выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно уменьшать эффективную концентрацию SIP.

2. Способ по п.1, в котором животное представляет собой человека.

3. Способ модулирования реакций заживления хирургических и травматических ран глаза животного, включающий введение указанному животному выделенного гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с SIP и содержит по меньшей мере один варибельный домен тяжелой цепи и по меньшей мере один варибельный домен легкой цепи, где по меньшей мере один варибельный домен тяжелой цепи содержит последовательность аминокислотных остатков AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID

NO: 6) и где выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно уменьшать эффективную концентрацию S1P.

4. Способ по п.3, в котором животное представляет собой человека.

5. Способ уменьшения или предупреждения воспаления глаза животного, включающий введение указанному животному выделенного гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с S1P и содержит по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи и по меньшей мере один переменный домен легкой цепи, где по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи содержит последовательность аминокислотных остатков AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 6) и где выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно уменьшать эффективную концентрацию S1P.

6. Способ по п.5, в котором животное представляет собой человека.

7. Способ уменьшения или предупреждения aberrантной неоваскуляризации глаза животного, включающий введение указанному животному выделенного гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с S1P и содержит по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи и по меньшей мере один переменный домен легкой цепи, где по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи содержит последовательность аминокислотных остатков AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 6) и где выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно уменьшать эффективную концентрацию S1P.

8. Способ по п.7, в котором животное представляет собой человека.

9. Способ ослабления глазной иммунной реакции животного, включающий введение указанному животному выделенного гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с S1P и содержит по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи и по меньшей мере один переменный домен легкой цепи, где по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи содержит последовательность аминокислотных остатков AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 6) и где выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно уменьшать эффективную концентрацию S1P.

10. Способ по п.9, в котором животное представляет собой человека.

11. Способ уменьшения эффективной глазной концентрации или активности биоактивного липида у животного, включающий введение указанному животному выделенного гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с S1P и содержит по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи и по меньшей мере один переменный домен легкой цепи, где по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи содержит последовательность аминокислотных остатков AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 6) и где выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно уменьшать эффективную концентрацию S1P.

12. Способ по п.11, в котором животное представляет собой человека.

13. Способ лечения глазной болезни или патологического состояния у субъекта, включающий введение указанному субъекту фармацевтической композиции, содержащей выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с S1P и содержит по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина и по меньшей мере один переменный домен легкой цепи иммуноглобулина, где по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина содержит последовательность аминокислотных остатков AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 6), где выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно уменьшать эффективную концентрацию S1P и где глазная болезнь или патологическое состояние характеризуется, по меньшей мере частично, aberrантным фиброгенезом, фиброзом или рубцеванием.

14. Способ по п.13, в котором глазная болезнь или патологическое состояние, характеризуемое, по меньшей мере частично, aberrантным фиброгенезом, фиброзом или рубцеванием, выбрано из группы, состоящей из возрастной макулярной дегенерации, диабетической ретинопатии, ретинопатии недоношенных, серповидно-клеточной ретинопатии, ишемических ретинопатий, ретинальной веноокклюзионной болезни, макулярной складки, целлофановой ретинопатии, образования ERM, переутомления от контактных линз, тракционного отслоения сетчатки, пролиферативной витреоретинопатии, травматического повреждения, глазного рубцующего пемфигоида, синдрома Стивенса-Джонсона, токсического эпидермального некролиза, птеригиума и последствий глазной хирургии, включая рефракционную хирургию, витректомию и хирургию глаукомы.

15. Способ лечения глазной болезни или патологического состояния у субъекта, включающий введение указанному субъекту фармацевтической композиции, содержащей выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с S1P и содержит по меньшей мере один переменный домен тяже-

лой цепи иммуноглобулина и по меньшей мере один переменный домен легкой цепи иммуноглобулина, где по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина содержит последовательность аминокислотных остатков AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 6), где выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно уменьшать эффективную концентрацию S1P и где глазная болезнь или патологическое состояние представляют собой возрастную макулярную дегенерацию, воспалительное заболевание, в том числе увеит и витрит, инфекционное заболевание, включая инфекцию простого герпеса, инфекцию опоясывающего герпеса и протозойную инфекцию, а также отторжение роговичного трансплантата и глазной гистоплазмоз.

16. Способ лечения глазной болезни или патологического состояния у субъекта, включающий введение указанному субъекту фармацевтической композиции, содержащей выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с S1P и содержит по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина и по меньшей мере один переменный домен легкой цепи иммуноглобулина, где по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина содержит последовательность аминокислотных остатков AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 6), где выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно уменьшать эффективную концентрацию S1P, в котором глазная болезнь или патологическое состояние характеризуется, по меньшей мере частично, aberrантной неоваскуляризацией.

17. Способ по п.16, в котором глазная болезнь или патологическое состояние, характеризующееся, по меньшей мере частично, aberrантной неоваскуляризацией, выбирают из группы, состоящей из возрастной макулярной дегенерации, диабетической ретинопатии, ретинопатии недоношенных, отторжения роговичного трансплантата, неоваскулярной глаукомы, переутомления от контактных линз, инфекционных заболеваний роговицы, включая инфекцию простого герпеса, инфекцию опоясывающего герпеса и протозойную инфекцию; птеригиума, ишемической ретинопатии, ретинальной веноокклюзионной болезни, инфекционного увеита, хронического отслоения сетчатки, повреждения лазером, серповидноклеточной ретинопатии, веноокклюзионной болезни, хориоидальной неоваскуляризации, ретинальной ангиоматозной пролиферации и идиопатической полипозной хориоидальной васкулопатии.

18. Способ по пп.13, 15 или 16, где субъектом является человек.

19. Способ по пп.13, 15 или 16, в котором фармацевтическую композицию используют системно, местно, посредством интравитреальной или окологлазной инъекции, ионофореза, спрея или капель или как часть *in situ* геля, глазной вставки, роговичной накладки или контактных линз, липосомы, ниосомы/дискомы, мукоадгезивной системы, систем с лиофилизированным носителем, аэрозоля, субмикронной эмульсии, дендримера, микросферы, наносферы или колласомы либо их комбинации.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с S1P и содержит по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи и по меньшей мере один переменный домен легкой цепи, где по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи содержит последовательность аминокислотных остатков AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 6), в фармацевтически приемлемом носителе для улучшения течения, профилактики или лечения заболеваний и/или состояний, указанных в одном или нескольких предыдущих пунктах.

21. Фармацевтическая композиция по п.20, которая подходит для внутриглазного применения или наружного применения на глазу.

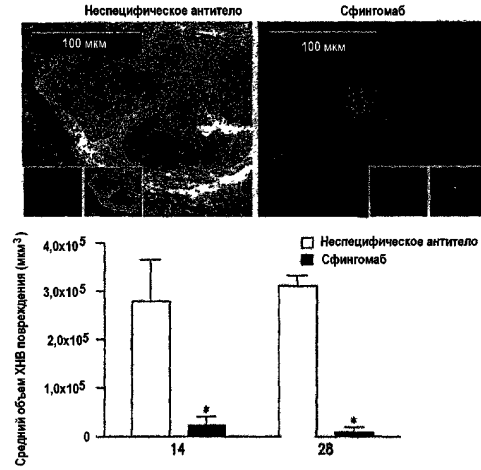
22. Фармацевтическая композиция по п.20, где фармацевтическая композиция содержит фосфатный буферный раствор.

23. Способ лечения склеродермии у субъекта, включающий введение указанному субъекту фармацевтической композиции, содержащей выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с S1P и содержит по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи и по меньшей мере один переменный домен легкой цепи, где по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи содержит последовательность аминокислотных остатков AISPRHDITKYNEMFRG (SEQ ID NO: 6) и где выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно уменьшать эффективную концентрацию S1P.

24. Способ по п.23, в котором фармацевтическую композицию применяют системно, внутривенно, подкожно, мукозально, посредством ингаляции или местно.

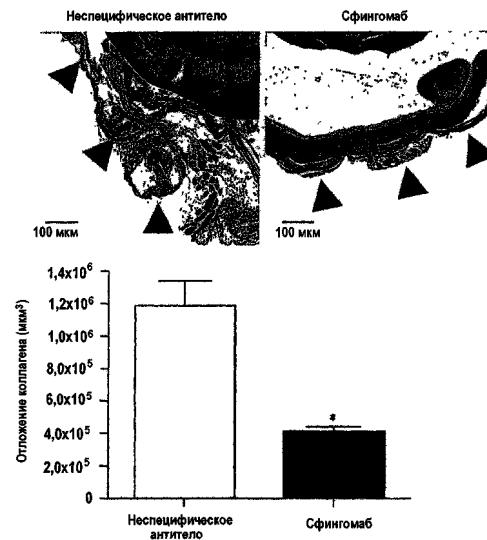
25. Способ по п.23, в котором субъект представляет собой человека.

Сфингомаб ингибирует образование ХНВ повреждения в модели индуцированного лазером разрыва оболочки Бруха на мышах

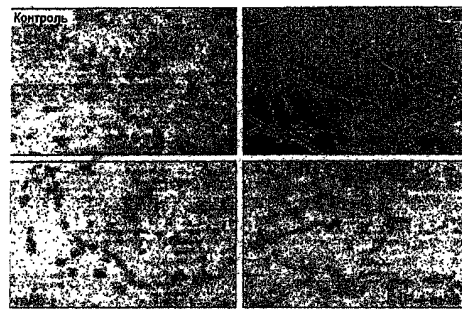


Фиг. 1А

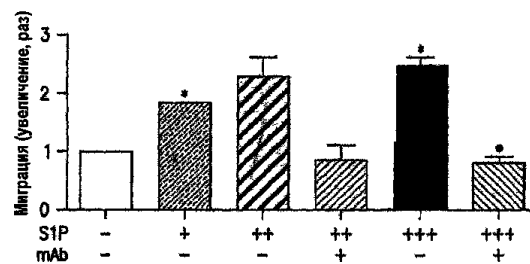
Сфингомаб ингибирует отложение коллагена в модели индуцированного лазером разрыва оболочки Бруха на мышах



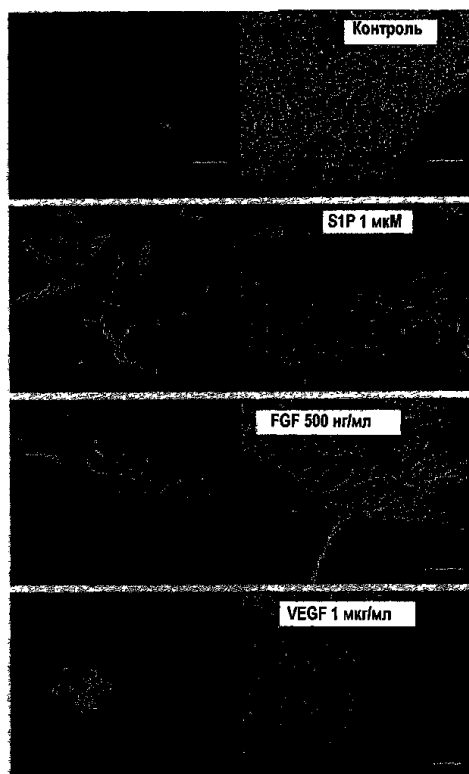
Фиг. 1В



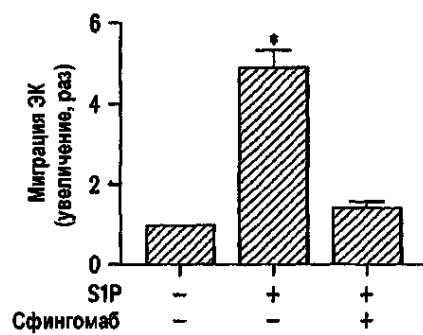
Фиг. 2А



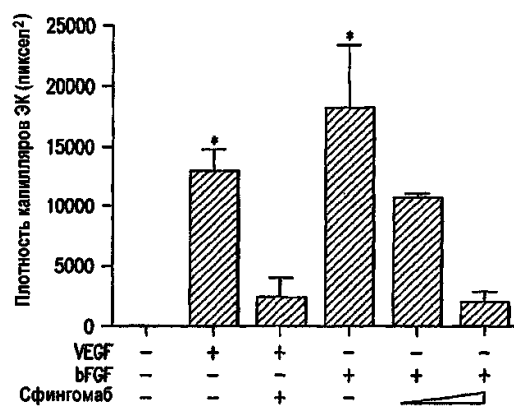
Фиг. 2В



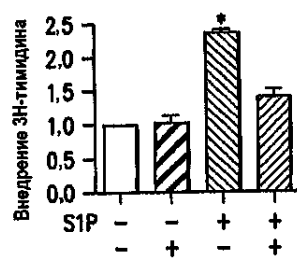
Фиг. 3А



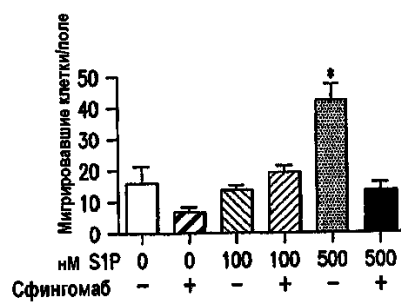
Фиг. 3В



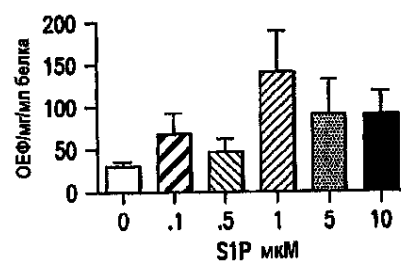
Фиг. 3С



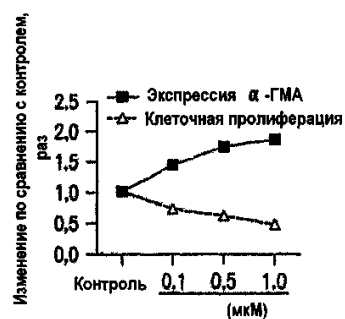
Фиг. 4А



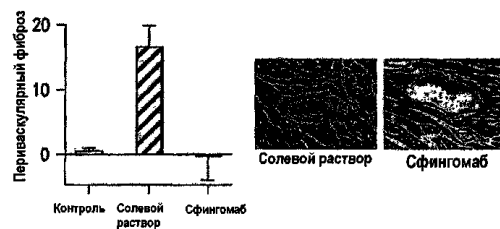
Фиг. 4В



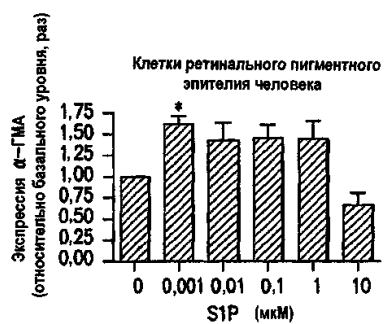
Фиг. 4С



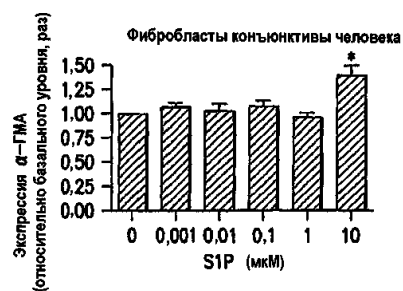
Фиг. 4D



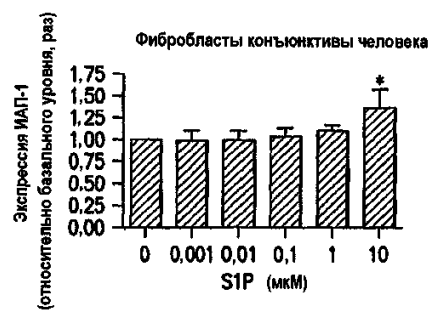
Фиг. 4Е



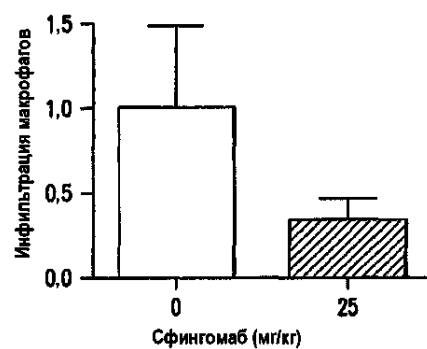
Фиг. 5А



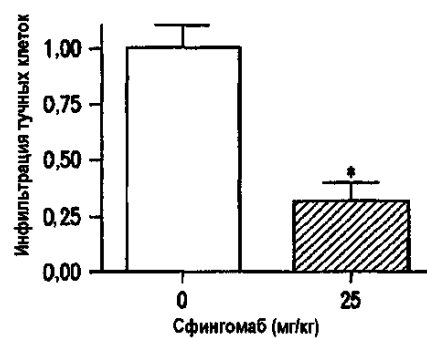
Фиг. 5В



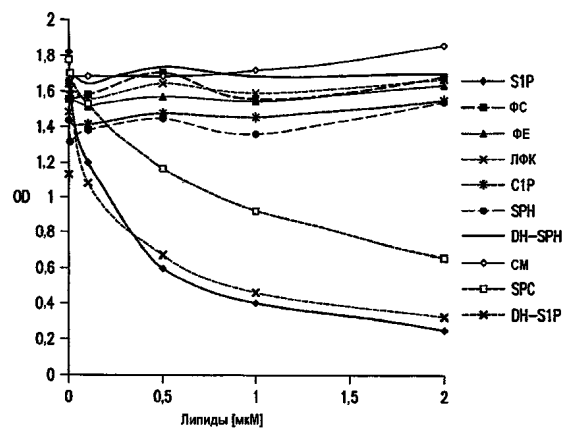
Фиг. 5С



Фиг. 6А



Фиг. 6В



Фиг. 7



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2