



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.01.14

(51) Int. Cl. A61K 38/48 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.06.21

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПЕПТИДЫ СЕРИНОВОЙ ПРОТЕАЗЫ 1 МЕМБРАННОГО ТИПА (MTSP-1) И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/523,735; 62/664,051

(32) 2017.06.22; 2018.04.27

(33) US

(86) PCT/US2018/038844

(87) WO 2018/237201 2018.12.27

(71) Заявитель:

КАТАЛИСТ БАЙОСАЙЕНСИЗ, ИНК.
(US)

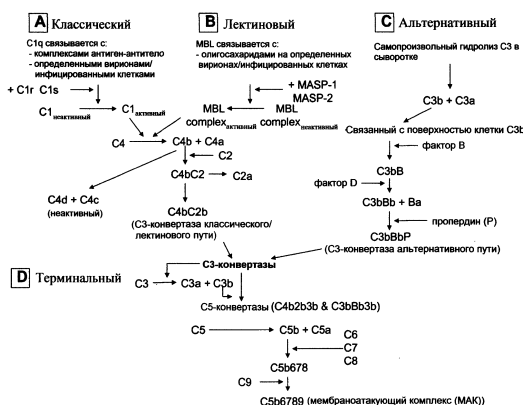
(72) Изобретатель:

Мэдисон Эдвин Льюис, Сорос
Ванесса, Попков Михаил (US)

(74) Представитель:

Стояченко И.Л. (RU)

(57) Раскрыты полипептиды MTSP-1, модифицированные для изменения активности и/или специфичности, с тем, чтобы они расщепляли белок комплемента, такой как белок C3 комплемента, тем самым ингибировали активацию комплемента. Модифицированные полипептиды MTSP-1, ингибирующие активацию комплемента, можно использовать для лечения заболеваний и состояний, в которых имеет значение активация комплемента. Эти заболевания и состояния включают воспалительные заболевания и заболевания с воспалительным компонентом. Примеры этих нарушений включают ишемические и реперфузионные нарушения, включая инфаркт миокарда и инсульт, сепсис, аутоиммунные заболевания, офтальмологические нарушения, такие как диабетическая ретинопатия и дегенерация желтого пятна, включая возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD), и отторжение трансплантированного органа, такое как отсроченная функция трансплантата (DGF) почки.



МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПЕПТИДЫ СЕРИНОВОЙ ПРОТЕАЗЫ 1 МЕМБРАННОГО ТИПА (MTSP-1) И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка претендует на приоритет предварительной заявки США номер 62/523,735, поданной 22 июня 2017 года (Мэдисон, Эдвин Л., Сорос, Ванесса и Попков Михаил) под названием "МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ СЕРИНОВОЙ ПРОТЕАЗЫ 1 МЕМБРАННОГО ТИПА (MTSP-1) И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ". Преимущество приоритета также заявлено в предварительной заявке США номер 62/664,051 (Мэдисон, Эдвин Л., Сорос, Ванесса и Попков, Михаил), поданной 27 апреля 2018 года (Мэдисон, Эдвин Л., Сорос, Ванесса и Попков, Михаил) под названием "МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ СЕРИНОВОЙ ПРОТЕАЗЫ 1 МЕМБРАННОГО ТИПА (MTSP-1) И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ". Полное содержание каждой из этих заявок включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПУТЕМ ССЫЛКИ НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Настоящим подана электронная версия Списка последовательностей, содержание которого полностью включено в качестве ссылки. Электронный файл был создан 18 июня 2018 года, имеет размер 1,4 мегабайта и называется 4939SEQPC001.txt.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение относится к модифицированным полипептидам MTSP-1, которые расщепляют белок комплемента, тем самым ингибируя активацию комплемента. Модифицированные полипептиды MTSP-1 могут применяться для лечения заболеваний и состояний, опосредованных комплементом, или заболеваний и состояний, в которых играет роль активация комплемента. Эти заболевания и состояния включают, но не ограничиваются ими, офтальмологические показания, включая дегенерацию желтого пятна, такие как возрастная дегенерация желтого пятна (AMD), диабетическая ретинопатия и болезнь Старгардта, почечная отсроченная функция трансплантата (DGF), ишемические и реперфузионные нарушения, включая инфаркт миокарда и инсульт, сепсис, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания и заболевания с воспалительным компонентом, включая болезнь Альцгеймера и другие нейродегенеративные нарушения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Система комплемента (C) является частью иммунной системы и играет роль в устранении вторжения патогенных микроорганизмов и в иницировании воспалительного

ответа. Система комплемента человека и других млекопитающих включает более 30 растворимых и мембраносвязанных белков, которые участвуют в упорядоченной последовательности реакций, приводящих к активации комплемента. Система комплемента крови имеет широкий спектр функций, связанных с широким спектром защитных механизмов организма, включая антимикробное и противовирусное действие. Продукты, полученные в результате активации C-компонентов комплемента, включают в себя не само-распознающие молекулы C3b, C4b и C5b, а также анафилатоксины C3a, C4a и C5a, которые влияют на различные клеточные иммунные ответы. Указанные анафилатоксины также действуют как провоспалительные агенты.

Система комплемента состоит из множества ферментов и неферментативных белков и рецепторов. Активация комплемента происходит одним из трех основных способов, известных как «классический» путь, «альтернативный» путь и «лектиновый» путь (см. Рисунок 1). Комплемент обычно активируется или запускается одним из трех вышеуказанных путей, которые, как показано на рис.1, сходятся на этапе активации C3. В четвертом механизме активации комплемента, называемом внутренним путем, сериновые протеазы, связанные с коагуляционным/фибринолитическим каскадом, активируют систему комплемента непосредственно через расщепление C3 или C5, независимо от классического, альтернативного и лектинового путей. Эти пути можно различить по процессу, который инициирует активацию комплемента. Классический путь инициируется комплексами антитело-антиген или агрегированными формами иммуноглобулинов. Альтернативный путь инициируется распознаванием структур на микробных и клеточных поверхностях; и лектиновый путь, который является независимым от антител, инициируется посредством связывания маннан-связывающего лектина (MBL, также называемый белком, связывающим маннозу) с углеводами, такими как те, которые отображаются на поверхности бактерий или вирусов. Активация каскадов приводит к образованию комплексов, участвующих в протеолизе или лизисе клеток, и пептидов, участвующих в опсонизации, анафилаксии и хемотаксисе.

Каскад комплемента, который представляет собой центральный компонент иммунного ответа у животных, является необратимым процессом. Многочисленные белковые кофакторы регулируют процесс. Неправильная регуляция процесса, обычно представляющая собой неуместную или неправильную активацию, может быть побочным эффектом или может возникать при различных нарушениях, которые включают неадекватные воспалительные и иммунные реакции, такие как те, что наблюдаются при острых и хронических воспалительных заболеваниях и других состояниях, включающих неадекватный иммунный ответ. Эти заболевания и расстройства включают аутоиммунные

заболевания, такие как ревматоидный артрит и волчанка, сердечные расстройства и другие воспалительные заболевания, такие как сепсис и синдром ишемии–реперфузии.

Из-за вовлечения путей комплемента в различные заболевания и состояния, компоненты путей комплемента являются мишенями для терапевтического вмешательства, особенно в отношении ингибирования пути. Примеры таких терапевтических средств включают синтетические и природные низкомолекулярные терапевтические средства, ингибиторы антител и рекомбинантные растворимые формы мембранных регуляторов комплемента. Существуют ограничения для стратегий приготовления таких терапевтических средств. Малые молекулы имеют короткий период полураспада *in vivo* и должны постоянно вводиться для поддержания ингибирования комплемента, тем самым ограничивая их роль, особенно при хронических заболеваниях. Терапевтические антитела могут приводить к иммунному ответу у субъекта и, таким образом, могут приводить к осложнениям при лечении, в частности, к методам лечения, предназначенным для модуляции иммунного ответа. Таким образом, существует потребность в терапевтических средствах для лечения опосредованных комплементом заболеваний и заболеваний, в которых активация комплемента играет роль. К ним относятся острые и хронические воспалительные заболевания. Соответственно, среди целей, поставленных здесь, целью является предоставление таких терапевтических средств для нацеливания на активацию каскада комплемента и предоставление терапевтических средств и способов лечения заболеваний.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Раскрыты модифицированные полипептиды MTSP–1, содержащие одну или более модификаций аминокислотных остатков I41S, Q38H, D60bT, F60eS или R, Y60gW, ins97aV, D96K, F97G, G151H или N и Q192T, в результате чего модифицированный полипептид MTSP–1 обладает повышенной активностью и/или специфичностью в отношении белка комплемента по сравнению с немодифицированной активной формой полипептида MTSP–1, где аминокислотные модификации выбраны среди замен, вставок и делеций в первичной аминокислотной последовательности немодифицированного полипептида MTSP–1; где модифицированный полипептид MTSP–1 расщепляет белок комплемента, тем самым ингибируя или уменьшая активацию комплемента по сравнению с активной формой немодифицированного полипептида MTSP–1, который не содержит аминокислотную модификацию(и); где аминокислотные остатки пронумерованы химотрипсиновой нумерацией, и соответствующие остатки определяются путем выравнивания с химотрипсином и нумеруются аналогично соответствующим остаткам химотрипсина; где немодифицированный полипептид MTSP–1 содержит последовательность аминокислот,

представленную в любой из SEQ ID NO: 1–4 (полноразмерный MTSP–1 дикого типа, протеазный домен дикого типа MTSP–1, зрелый MTSP–1 дикого типа, полноразмерный MTSP–1 с C122S, протеазный домен MTSP–1 с C122S, зрелый MTSP–1 с C122S) или его каталитически активный фрагмент или форму, которая включает аминокислотную модификацию(и). Модификации находятся в основной последовательности и включают в себя вставки, замены и удаления. Модифицированные полипептиды MTSP–1 включают модификации, которые улучшают или изменяют активность, и другие свойства, включая свойства, которые улучшают их применение в качестве фармацевтических препаратов. Например, модифицированные полипептиды MTSP–1 могут быть конъюгированы с фрагментами, которые увеличивают стабильность, период полужизни в сыворотке, срок годности и другие подобные свойства. Эти модификации включают конъюгирование модифицированного MTPS–1 с полимерами, такими как фрагменты ПЭГилирования, и другими полипептидами для нацеливания, идентификации и очистки.

Модифицированные полипептиды MTSP–1, раскрытые в данном документе, модифицированы для инактивации белка C3 комплемента посредством расщепления сайта, который инактивирует C3. Благодаря инактивации C3 активация комплемента уменьшается или ингибируется. В силу ингибирования или уменьшения активации комплемента любое заболевание, состояние или расстройство, в котором комплемент играет роль или в котором уменьшение активации комплемента может лечить или уменьшать симптомы или патологию заболевания или расстройства, можно лечить с помощью модифицированного полипептида MTSP–1, представленного в настоящем документе. Целевые сайты для инактивационного расщепления в белке C3 включают остатки 737–744; и расщепление в этих остатках, например, между остатками 740 и 741 SEQ ID NO: 9 (Q H A R ↓ A S H L), инактивирует C3. Активность/специфичность расщепления C3 может быть увеличена по сравнению с активной формой немодифицированного полипептида MTSP–1, который не содержит модификацию (и) аминокислот. Модифицированные полипептиды MTSP–1, раскрытые в данном документе, предназначены для увеличения активности в отношении расщепления C3, которая, по меньшей мере, такая же или больше, чем у активной формы, такой как полноразмерный или протеазный домен, немодифицированного полипептида MTSP –1 с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4 (протеазный домен со свободным цистеином, C122 по химотрипсиновой нумерации, заменен на S). Активность расщепления для инактивации C3 может быть увеличена как угодно, например, по меньшей мере, на 0,5, на 1, может быть увеличена в 1,2 раза, в 1,5 раза, в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 раз, а также в 9, 10 или более раз, по сравнению с активностью немодифицированного модифицированного полипептида MTSP–1 с SEQ ID NO: 4. Немодифицированный

полипептид MTSP–1 выбран из полипептидов с последовательностью SEQ ID NO: 1–4 и их каталитически активных частей.

Модифицированный полипептид MTSP–1, включающий, по меньшей мере, одну модификацию, такую как I41S, Q38H, D60bT, F60eS или R, Y60gW, ins97aV, D96K, F97G, G151H или N и Q192T, или комбинации этих или других замен, как представлено в данном документе, имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с полипептидами по любой из SEQ ID NOs: 1 – 4. Модифицированный полипептид MTSP–1 может иметь, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 модификаций, включая вставки, делеции и замены в первичной последовательности полипептидов любой из SEQ ID NO: 1–4 и их каталитически активных частях.

Например, представленные в данном документе модифицированные полипептиды MTSP–1 содержат модификацию, соответствующую любой одной или более из I41S, Q38H, D60bT, F60eS, oY60gW, ins97aV, D96K, F97G, G151H, G151N, Q192T, Q192D и/или Q192E. Модифицированные полипептиды MTSP–1 также могут включать дополнительные замены, соответствующие и выбранные из одной или более из F60eR, Y59F, F99L, T98P, Q175L или выбранные из одной или нескольких модификаций в положении, соответствующем D217, например D217V, I, L, W или M, I41D, E, T, G или R по химотрипсиновой нумерации. Типичные модифицированные полипептиды MTSP–1 включают модифицированные полипептиды MTSP–1, которые содержат модификации I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T; I41D/C122S/G151N/Q192T; I41S/F99L/C122S/G151N/Q192V; или I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T, или модификации, которые представляют собой идентичные вышеуказанным модификации за исключением того, что остаток C122S представляет собой C122C.

Другие типичные модифицированные полипептиды MTSP–1 включают модификации, соответствующие любым из модификаций:

I41R/F97T/Ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E или
I41R/F97T/Ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,
I41D/Y59F/D96E/F99L/C122S/G151N/Q192T или
I41D/Y59F/C122S/G151N/Q192T.

Также, раскрытые в данном документе модифицированные полипептиды MTSP–1 включают модификации, соответствующие любым из:

I41R/F97T/Ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E, или
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,
или

Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,
или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E,
или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
или

Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,
или

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
или

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97Y/ins97aN/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q1
92D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q1
92D, или

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/F97W/ins97aN/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q
192E, или

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D, или
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/F97E/ins97aV/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q1
92D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96L/F97D/ins97aG/T98N/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q1
92E, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q1
92D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96V/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q1
92D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q1
92D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L,
или

I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T, или I41D/C122S/G151N/Q192T, или
 I41S/F99L/C122S/G151N/Q192V, или I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T, или
 I41D/Y59F/D96E/F99L/C122S/G151N/Q192T, или I41D/Y59F/C122S/G151N/Q192T, или
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 или
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 или
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 или
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 или
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, или
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, или
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/F99L/C122S/G151H/Q175 L/Q192D,
 или
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 или
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 или
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q192D,
 или
 Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D, или
 I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, или
 I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D, или
 Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, или
 Q38H/I41S/D60bY/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D/D217V, или
 I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V, или
 I41S/D60bY/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D/D217V, или
 I41S/D96M/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V, или
 I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192V/D217I, или
 I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192H, или
 I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192N/D217V, или
 I41S/D60bY/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, или
 Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V, или
 I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192V, или

I41S/P49S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V, или
 I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192N/I217V, или
 I41T/F97W/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192G/D217L, или
 I41G/F97L/F99L/C122S/Q175A/Q192T/D217V, или
 I41G/F97V/F99L/C122S/G151Q/Q175M/Q192A/D217L, или
 I41G/F97I/F99L/C122S/G151L/Q175M/Q192S/D217V, или
 I41G/F97S/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G/D217I, или
 I41T/F97L/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192S/D217W, или
 I41D/F97T/F99M/C122S/Q192V/D217M, или те же модификации, за исключением того, что C122S не была модифицирована и представляет собой C122C.

Также, в данном документе раскрыты модифицированные полипептиды MTSP-1, которые включают модификации, выбранные из комбинаций, включающих одну или несколько модификаций из Q38H, I41S, D60bT, F60eS, Y60gW, D96K, F97G, Ins97aV и G151H, такие как:

G151H, Ins97aV, Ins97aV/G151H, F97G, F97G/G151H, F97G/Ins97aV, F97G/Ins97aV/G151H, D96K, D96K/G151H, D96K/Ins97aV,

D96K/Ins97aV/G151H, D96K/F97G, D96K/F97G/G151H, D96K/F97G/Ins97aV, D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Y60gW, Y60gW/G151H, Y60gW/Ins97aV, Y60gW/Ins97aV/G151H, Y60gW/F97G, Y60gW/F97G/G151H, Y60gW/F97G/Ins97aV, Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Y60gW/D96K, Y60gW/D96K/G151H, Y60gW/D96K/Ins97aV, Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, Y60gW/D96K/F97G, Y60gW/D96K/F97G/G151H, Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV, Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, F60eS, F60eS/G151H, F60eS/Ins97aV,

F60eS/Ins97aV/G151H, F60eS/F97G, F60eS/F97G/G151H, F60eS/F97G/Ins97aV, F60eS/F97G/Ins97aV/G151H, F60eS/D96K, F60eS/D96K/G151H, F60eS/D96K/Ins97aV, F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, F60eS/D96K/F97G, F60eS/D96K/F97G/G151H, F60eS/D96K/F97G/Ins97aV, F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, F60eS/Y60gW, F60eS/Y60gW/G151H, F60eS/Y60gW/Ins97aV, F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, F60eS/Y60gW/F97G, F60eS/Y60gW/F97G/G151H, F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV, F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, F60eS/Y60gW/D96K, F60eS/Y60gW/D96K/G151H, F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV, F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, F60eS/Y60gW/D96K/F97G,

F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H, F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV, F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, D60bT, D60bT/G151H, D60bT/Ins97aV, D60bT/Ins97aV/G151H, D60bT/F97G, D60bT/F97G/G151H, D60bT/F97G/Ins97aV,

D60bT/F97G/Ins97aV/G151H, D60bT/D96K, D60bT/D96K/G151H, D60bT/D96K/Ins97aV,
 D60bT/D96K/Ins97aV/G151H, D60bT/D96K/F97G, D60bT/D96K/F97G/G151H,
 D60bT/D96K/F97G/Ins97aV, D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, D60bT/Y60gW,
 D60bT/Y60gW/G151H, D60bT/Y60gW/Ins97aV, D60bT/Y60gW/Ins97aV/G151H,
 D60bT/Y60gW/F97G, D60bT/Y60gW/F97G/G151H, D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, D60bT/Y60gW/D96K, D60bT/Y60gW/D96K/G151H,
 D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV, D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H,
 D60bT/Y60gW/D96K/F97G, D60bT/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV, D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 D60bT/F60eS, D60bT/F60eS/G151H, D60bT/F60eS/Ins97aV, D60bT/F60eS/Ins97aV/G151H,
 D60bT/F60eS/F97G, D60bT/F60eS/F97G/G151H, D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV,
 D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H, D60bT/F60eS/D96K, D60bT/F60eS/D96K/G151H,
 D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV, D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H,
 D60bT/F60eS/D96K/F97G, D60bT/F60eS/D96K/F97G/G151H,
 D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV, D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 D60bT/F60eS/Y60gW, D60bT/F60eS/Y60gW/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/F97G,
 D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/D96K,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S, I41S/G151H, I41S/Ins97aV,
 I41S/Ins97aV/G151H, I41S/F97G, I41S/F97G/G151H, I41S/F97G/Ins97aV,
 I41S/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D96K, I41S/D96K/G151H, I41S/D96K/Ins97aV,
 I41S/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/D96K/F97G, I41S/D96K/F97G/G151H,
 I41S/D96K/F97G/Ins97aV, I41S/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/Y60gW,
 I41S/Y60gW/G151H, I41S/Y60gW/Ins97aV, I41S/Y60gW/Ins97aV/G151H,
 I41S/Y60gW/F97G, I41S/Y60gW/F97G/G151H, I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/Y60gW/D96K, I41S/Y60gW/D96K/G151H,
 I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV, I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/Y60gW/D96K/F97G,
 I41S/Y60gW/D96K/F97G/G151H, I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/F60eS, I41S/F60eS/G151H,
 I41S/F60eS/Ins97aV, I41S/F60eS/Ins97aV/G151H, I41S/F60eS/F97G,
 I41S/F60eS/F97G/G151H, I41S/F60eS/F97G/Ins97aV, I41S/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H,

I41S/F60eS/D96K, I41S/F60eS/D96K/G151H, I41S/F60eS/D96K/Ins97aV,
 I41S/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/F60eS/D96K/F97G, I41S/F60eS/D96K/F97G/G151H,
 I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV, I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 I41S/F60eS/Y60gW, I41S/F60eS/Y60gW/G151H, I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, I41S/F60eS/Y60gW/F97G,
 I41S/F60eS/Y60gW/F97G/G151H, I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/F60eS/Y60gW/D96K,
 I41S/F60eS/Y60gW/D96K/G151H, I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G,
 I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H, I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT, I41S/D60bT/G151H,
 I41S/D60bT/Ins97aV, I41S/D60bT/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F97G,
 I41S/D60bT/F97G/G151H, I41S/D60bT/F97G/Ins97aV, I41S/D60bT/F97G/Ins97aV/G151H,
 I41S/D60bT/D96K, I41S/D60bT/D96K/G151H, I41S/D60bT/D96K/Ins97aV,
 I41S/D60bT/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/D96K/F97G,
 I41S/D60bT/D96K/F97G/G151H, I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV,
 I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/Y60gW, I41S/D60bT/Y60gW/G151H,
 I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV, I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV/G151H,
 I41S/D60bT/Y60gW/F97G, I41S/D60bT/Y60gW/F97G/G151H,
 I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV, I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H,
 I41S/D60bT/Y60gW/D96K, I41S/D60bT/Y60gW/D96K/G151H,
 I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV, I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H,
 I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G, I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV, I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 I41S/D60bT/F60eS, I41S/D60bT/F60eS/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS/F97G,
 I41S/D60bT/F60eS/F97G/G151H, I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS/D96K,
 I41S/D60bT/F60eS/D96K/G151H, I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G,
 I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/G151H, I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,

I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H, Q38H/G151H,
 Q38H/Ins97aV, Q38H/Ins97aV/G151H, Q38H/F97G, Q38H/F97G/G151H,
 Q38H/F97G/Ins97aV, Q38H/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D96K, Q38H/D96K/G151H,
 Q38H/D96K/Ins97aV, Q38H/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/D96K/F97G,
 Q38H/D96K/F97G/G151H, Q38H/D96K/F97G/Ins97aV, Q38H/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/Y60gW, Q38H/Y60gW/G151H, Q38H/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/Y60gW/F97G,
 Q38H/Y60gW/F97G/G151H, Q38H/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 Q38H/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/Y60gW/D96K,
 Q38H/Y60gW/D96K/G151H, Q38H/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/Y60gW/D96K/F97G,
 Q38H/Y60gW/D96K/F97G/G151H, Q38H/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS, Q38H/F60eS/G151H,
 Q38H/F60eS/Ins97aV, Q38H/F60eS/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS/F97G,
 Q38H/F60eS/F97G/G151H, Q38H/F60eS/F97G/Ins97aV, Q38H/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/F60eS/D96K, Q38H/F60eS/D96K/G151H, Q38H/F60eS/D96K/Ins97aV,
 Q38H/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS/D96K/F97G,
 Q38H/F60eS/D96K/F97G/G151H, Q38H/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW,
 Q38H/F60eS/Y60gW/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/F97G,
 Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/D96K,
 Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G,
 Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT, Q38H/D60bT/G151H,
 Q38H/D60bT/Ins97aV, Q38H/D60bT/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F97G,
 Q38H/D60bT/F97G/G151H, Q38H/D60bT/F97G/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/D96K, Q38H/D60bT/D96K/G151H,

Q38H/D60bT/D96K/Ins97aV, Q38H/D60bT/D96K/Ins97aV/G151H,
 Q38H/D60bT/D96K/F97G, Q38H/D60bT/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV, Q38H/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/D60bT/Y60gW, Q38H/D60bT/Y60gW/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/F97G,
 Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/D96K,
 Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G,
 Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS,
 Q38H/D60bT/F60eS/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/F97G,
 Q38H/D60bT/F60eS/F97G/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/D96K,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/G151H,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S, Q38H/I41S/G151H,
 Q38H/I41S/Ins97aV, Q38H/I41S/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F97G,
 Q38H/I41S/F97G/G151H, Q38H/I41S/F97G/Ins97aV, Q38H/I41S/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/D96K, Q38H/I41S/D96K/G151H, Q38H/I41S/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D96K/Ins97aV/G151H,

Q38H/I41S/D96K/F97G, Q38H/I41S/D96K/F97G/G151H, Q38H/I41S/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/Y60gW, Q38H/I41S/Y60gW/G151H,
 Q38H/I41S/Y60gW/Ins97aV, Q38H/I41S/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/Y60gW/F97G,
 Q38H/I41S/Y60gW/F97G/G151H, Q38H/I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/Y60gW/D96K,
 Q38H/I41S/Y60gW/D96K/G151H, Q38H/I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G,
 Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/G151H, Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS,
 Q38H/I41S/F60eS/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Ins97aV, Q38H/I41S/F60eS/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/F60eS/F97G, Q38H/I41S/F60eS/F97G/G151H, Q38H/I41S/F60eS/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS/D96K,
 Q38H/I41S/F60eS/D96K/G151H, Q38H/I41S/F60eS/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G,
 Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/G151H, Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT,
 Q38H/I41S/D60bT/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Ins97aV, Q38H/I41S/D60bT/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F97G, Q38H/I41S/D60bT/F97G/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/D96K,
 Q38H/I41S/D60bT/D96K/G151H, Q38H/I41S/D60bT/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G,
 Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/G151H, Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV,

Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, или те же модификации, за
 исключением того, что C122S не была модифицирована и представляет собой C122C.

Также раскрыты модифицированные полипептиды MTSP-1, которые включают в
 себя модификации, соответствующие любой из: T98P/F99LQ175L/Q192D, необязательно
 C122S, и одной или более из выбранных среди: Q38H, I41S, D60bT, F60eS, Y60gW, D96K,
 F97G, Ins97aV и G151H, а именно:

T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, D60bT/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, I41S/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

I41S/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

I41S/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, или те же модификации, за исключением того, что C122S не была модифицирована и представляет собой C122C.

Другие типичные модифицированные полипептиды MTSP-1, представленные в данном документе, могут содержать замены, вставки и/или делеции, соответствующие: Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/G151H/Q175L/Q192D,

включая те, в которых немодифицированный полипептид MTSP-1 содержит или же представляет собой протеазный домен, последовательность которого указана в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. Другие такие примеры модифицированных полипептидов MTSP-1 включают, но не ограничиваются ими:

модифицированные полипептиды MTSP-1, содержащие модификации, выбранные из комбинаций модификаций, в которых протеазный домен расщепляет человеческий C3 *in vitro* с EC₅₀ менее 10 нМ, а именно выбранные из:

ins97aA/F97G/T98L/C122S/Q175M/Q192A/D217I/K224R,

Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L,

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E,

Q38G/H40R/I41H/D60bN/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G,

Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L,

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E,

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96F/F97D/ins97aE/T98S/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192A,
 Q38F/I41A/D60bT/F60eG/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eT/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E,
 Q38Y/I41A/D60bL/F60eQ/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192A,
 Q38H/I41S/D60bF/F60eV/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192A,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eA/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192V,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96Mns97aN/F97Y/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96L/ins97aG/F97D/T98N/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38F/I41S/D60bF/F60eR/Y60gF/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192V,
 Q38H/I41S/D60bY/D96Y/ins97aV/F97D/T98P/F99L/L106M/C122S/1136M/Q192G/Q209L/D217T,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96S/ins97aR/F97A/T98S/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192T,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96Mns97aN/F97Y/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41A/D60bT/F60eH/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 ins97aY/F97G/T98V/C122S/Q175M/Q192S/D217V,
 Q38H/I41S/D60bS/ins97aV/F97D/T98P/F99L/M117L/C122S/1136T/Q192G/D2171,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96FF97N/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192A,
 H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192G/D217V/K224Y,

I41G/F97I/F99L/C122S/G151L/Q175M/Q192S/D217V,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96V/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96FF97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/T150S/G151H/Q175L/Q192D/Q209L,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eW60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41A/D60bW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136M/Q192G/D217N,
 Q38H/I41S/D60bF/F60eT/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/H143Q/G151N/Q175L/Q192G,
 Q38Y/I41S/D60bT/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41A/F60eH/Y60gW/ins97aE/F97T7T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192A,
 I41T/D60bW/F60eH/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96F/F97Y/ins97aD/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97S/ins97aH/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E,
 I41S/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192G/D217V,
 Q38M41S/D60bY/F60eD/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192A,
 Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,
 H40R/I41H/Y60gH/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192G/D217I/K224L,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97D/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97Y/ins97aN/T98G/F99M/C122S/G151N/Q175L/Q192G,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/F97N/ins97aE/T98S/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,

а также из модификаций, которые представляют собой идентичные вышеуказанным модификации, за исключением того, что остаток C122S не был модифицирован и представляет собой C122C (т.е. в положении 122 аминокислотной последовательности MTSP-1 не происходило замены Cys на Ser).

Примерами модифицированных полипептидов MTSP-1, представленных в настоящем документе, являются те полипептиды, которые содержат или имеют последовательности, приведенные в любой из SEQ ID NO: 6, 8, 21–59 и 63–81, включая модифицированный полипептид MTSP-1, последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 42. Полипептиды MTSP-1, которые содержат модификации Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D (как с C122S, так и без C122S), также являются примерами таких полипептидов.

Для всех модифицированных полипептидов MTSP-1, представленных в настоящем документе, немодифицированные полипептиды MTSP-1 включают полипептиды, которые содержат или имеют последовательность аминокислотных остатков, указанных в SEQ ID NO: 2 или 4 (протеазный домен). Полипептиды MTSP-1 включают полноразмерные двухцепочечные формы, двухцепочечные активированные формы и одноцепочечные формы, которые содержат протеазный домен или его каталитически активную часть.

Модифицированные полипептиды MTSP-1 выбирали для расщепления и инактивации C3 с таким расчетом, чтобы активация комплемента *in vivo* уменьшалась. Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, включают полипептиды, которые расщепляются внутри остатков QHARASHL (остатки 737–744) белка C3 человека (SEQ ID NO: 9), таких как полипептиды, в которых P1–P1' представляет собой RA.

Все или любые модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, могут включать структурные модификации и посттрансляционные модификации, такие как добавления полимера(ов) для увеличения времени полужизни в сыворотке и/или для снижения иммуногенности, или того и другого.

Структурные модификации включают изменения в гликозилировании, такие как добавление сайтов гликозилирования или типа гликозилирования, а также добавления полимеров, таких как декстран, сиалилирование и ПЭГи́лирование. Любой из модифицированных полипептидов MTSP-1 может быть ПЭГи́лирован для увеличения периода полужизни и/или стабильности сыворотки, особенно для показаний, при которых желательна длительная продолжительность действия. Модифицированный полипептид MTSP-1 может быть дополнительно модифицирован, например, путем добавления или удаления лизинов или других остатков для изменения ПЭГи́лирования или путем добавления или удаления сайтов гликозилирования.

Также, в в данном документе раскрыты слитые белки, содержащие модифицированный полипептид MTSP-1 или каталитически активную часть модифицированного полипептида MTSP-1, раскрытые в данном документе, слитые или

иным образом конъюгированные через химический или физический линкер или связь с полипептидом не – MTSP-1 протеазы или его частью. Примером таких непротеазных полипептидов является домен мультимеризации, такой как домен Fc или домен белковой трансдукции (PTD).

Также, в в данном документе раскрыты молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любой из модифицированных полипептидов MTSP-1 и слитых белков, представленных в настоящем документе. Кроме того, настоящий документ предусматривает векторы, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты. Векторы могут быть прокариотическими или эукариотическими векторами и включают векторы экспрессии, вирусные векторы и векторы для генной терапии. Вирусные векторы включают, но не ограничиваются ими, вектор простого вируса герпеса или вектор вируса коровьей оспы, или аденовирусный вектор, или ретровирусный вектор, или вектор насекомых.

В в данном документе раскрыты изолированные клетки, изолированные клетки, отличные от клеток человека (которые не могут развиваться в зиготу или человека любым способом, доступным специалистам в данной области), и клеточные культуры, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты или молекулы нуклеиновой кислоты или векторы, кодирующие модифицированные полипептиды MTSP-1, представленные в настоящем документе. Предлагаются способы получения модифицированных полипептидов MTSP-1, которые включают способы синтеза аминокислот и способы рекомбинантных ДНК. Они включают введение нуклеиновой кислоты или вектора, кодирующего модифицированный полипептид MTSP-1, представленный здесь, в клетку; культивирование клетки в условиях, при которых полипептид экспрессируется; и, необязательно, выделение или очистку экспрессированного модифицированного полипептида MTSP-1. Клетки включают любые подходящие клетки или клеточные линии, включая эукариотические клетки или прокариотические клетки. К ним относятся бактериальные клетки, клетки млекопитающих и дрожжевые клетки. Например, клетка может быть клеткой CHO, клеткой BFDC, *saccharomyces*, *Pichia* и соответствующими клетками млекопитающих. Клетки и способы получения рекомбинантных терапевтических полипептидов хорошо известны специалистам в данной области.

Нуклеиновые кислоты, векторы и полипептиды могут быть использованы для лечения или в способах заболевания или состояния, опосредованного или включающего активацию комплемента, где ингибирование активации комплемента влияет на лечение или ослабление заболевания или состояния. Нуклеиновые кислоты и векторы могут быть использованы для генной терапии или могут быть введены полипептиды. Подходящие пути

введения включают парентеральные, местные, системные и трансдермальные пути. Они включают внутривенное, внутримышечное, подкожное и интравитреальное введение.

В данном документе раскрыты способы лечения заболевания или состояния, опосредованного или включающего активацию комплемента, где ингибирование или уменьшение эффекта активации лечения или некоторого ослабления симптомов или предотвращения (уменьшения риска) такого заболевания или состояния. Нуклеиновую кислоту, вектор или полипептид вводят субъекту для лечения или предотвращения (снижения риска или симптомов) заболевания или состояния. Опосредованные комплементом заболевания или расстройства или состояния включают, но не ограничиваются ими, воспалительное заболевание и состояние, сепсис, ревматоидный артрит (РА/RA), глазное или офтальмологическое заболевание, сердечно-сосудистое заболевание, мембранопролиферативный гломерулонефрит (МБПГН/MPGN), глазные или офтальмологические заболевания или расстройства, рассеянный склероз (РС/MS), миастения (МГ/МГ), астма, воспалительное заболевание кишечника, острое воспалительное повреждение тканей, вызванное иммунным комплексом (ИК/IC), болезнь Альцгеймера (БА/AD), отторжение трансплантированного органа и синдром ишемии-реперфузии.

Заболевание или состояние может представлять собой глазное или офтальмологическое заболевание или отторжение или воспаление вследствие трансплантированного органа. Примером таких заболеваний, нарушений или состояний является диабетическая ретинопатия или дегенерация желтого пятна, включая возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD) и отсроченную функцию трансплантата (DGF) почки.

Представленные здесь полипептиды можно использовать для ингибирования активации комплемента путем контактирования модифицированного полипептида MTSP-1 с белком C3 комплемента, в результате чего белок C3 комплемента расщепляется, так что активация комплемента уменьшается или ингибируется. Субъектами для лечения полипептидами, способами и применениями в данном документе могут быть любые животные, включая людей, и домашние животные, в частности, собаки, кошки и другие домашние животные, и сельскохозяйственные животные. Ингибирование активации комплемента может снизить риск развития (предотвратить развитие) заболевания, состояния или расстройства или уменьшить развитие симптомов такого заболевания, состояния или расстройства. Ингибирование активации комплемента, среди его эффектов, приводит к уменьшению воспалительных симптомов, связанных с опосредованным комплементом заболеванием или расстройством, выбранным из воспалительного расстройства, нейродегенеративного расстройства и сердечно-сосудистого расстройства.

Как отмечено выше, опосредованные комплементом заболевания или расстройства или состояния включают, но не ограничиваются ими, сепсис, ревматоидный артрит (RA), глазные или офтальмологические расстройства, мембранопролиферативный гломерулонефрит (MPGN), рассеянный склероз (MS), отсроченную функцию трансплантата, воспаление трансплантированных органов или тканей, миастения (MG; МГ), астма, воспалительное заболевание кишечника, острое воспалительное повреждение тканей, вызванное иммунным комплексом (IC), болезнь Альцгеймера (AD) и синдром ишемии–реперфузии, и любые другие, известные специалистам в данной области техники.

Опосредованное комплементом заболевание, состояние или расстройство может возникнуть в результате лечения субъекта. Например, синдром ишемии–реперфузии может быть вызван событием или лечением, выбранным из инфаркта миокарда (IM), инсульта, ангиопластики, шунтирования коронарной артерии, сердечно–легочное шунтирование (применение аппарата искусственного кровообращения (АИК), cardiopulmonary bypass (CPB)) и гемодиализа.

Лечение модифицированным полипептидом MTSP–1, представленным в настоящем документе, может быть проведено до лечения субъекта, которое приводит к возникновению или имеет риск возникновения опосредованного комплементом расстройства, состояния или заболевания.

Настоящий документ предусматривает применение модифицированных полипептидов MTSP–1, представленных в настоящем документе, и способов лечения заболевания или состояния, опосредованного или включающего активацию комплемента, путем введения модифицированного полипептида MTSP–1, представленного в настоящем документе, где ингибирование активации комплемента приводит к лечению или ослаблению заболевания или состояния. Модифицированные полипептиды MTSP–1 также можно вводить для снижения риска (предотвращения) развития заболевания или состояния или для уменьшения симптомов развития такого заболевания, расстройства или состояния. Опосредованные комплементом заболевания, состояния или расстройства включают любые отмеченные выше или ниже, включая глазные или офтальмологические заболевания или отторжение пересаженного органа или воспаление, обусловленное трансплантацией органа. Такие заболевания и состояния включают диабетическую ретинопатию и дегенерацию желтого пятна, такую как AMD, и отсроченную функцию трансплантата (DGF) почки. Модифицированный полипептид MTSP–1 (или кодирующая молекула нуклеиновой кислоты или вектор) может быть введен любым подходящим путем, в том числе обсуждаемым выше и в других местах документа, например, парентерально, внутривенно или подкожно. Для лечения офтальмологических нарушений

модифицированные полипептиды MTSP-1 можно вводить локально, например, путем интравитреальной инъекции или путем местного нанесения на глаза. Модифицированный полипептид MTSP-1 может быть модифицирован для введения в глаз, например, путем слияния с доменом белковой трансдукции для облегчения трансдукции в стекловидное тело.

Для любого применения, способа или применения модифицированный полипептид MTSP-1 можно модифицировать для увеличения периода полужизни в сыворотке, например, путем ПЭГилирования.

Также, в данном документе раскрыты комбинации и наборы, которые включают: (a) модифицированный полипептид MTSP-1, представленный в настоящем документе; и (b) второй агент или агенты для лечения опосредованного компонентом заболевания или расстройства. Вторые агенты включают, но не ограничиваются ими, противовоспалительный агент(ы) и антикоагулянт(ы), такие как, без ограничения, любой один или более из нестероидных противовоспалительных препаратов (NSAID), антиметаболит, кортикостероид, анальгетик, цитотоксический агент, ингибитор провоспалительных цитокинов, противовоспалительные цитокины, агенты, нацеленные на В-клетки, соединения, нацеленные на Т-антигены, блокаторы молекул адгезии, антагонисты хемокиновых рецепторов, ингибиторы киназы, лиганды PPAR- γ (гамма), ингибиторы комплемента, гепарин, варфин, аценокумарол, фениндион, ЭДТА, цитрат, оксалат, аргатробан, лепирудин, бивалирудин и ксимелагатран.

Раскрытые в данном документе способы, применения или комбинации охватывают те, в которых модифицированный полипептид MTSP-1 включает модификацию I41D или I41S, в частности I41S, и в особенности те, где модифицированные полипептиды MTSP-1 содержат

модификации:

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D

или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/G151H/Q175L/Q192D, или I41D/C122S/G151N/Q192T, или I41D/G151N/Q192T. Замена C122S (со ссылкой на протеазный домен) включена для удаления свободного цистеина для уменьшения агрегации. Немодифицированный полипептид MTSP-1 включает протеазный домен, такой как домен с последовательностью аминокислотных остатков, указанной в SEQ ID NO: 4, такой как модифицированный полипептид MTSP-1, который содержит последовательность аминокислотных остатков, указанную в любом из SEQ ID NO: 35 и 42.

Представлены способы лечения (DGF) путем внутривенного введения модифицированного полипептида MTSP-1, представленного в настоящем документе,

такого как модифицированный полипептид MTSP-1, который содержит последовательность аминокислотных остатков, указанную в любом из SEQ ID NO: 35 и 42, или его каталитически активную часть, и такого как модифицированный полипептид MTSP-1, который содержит следующие замены: Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D. Дозировки включают любую подходящую дозу и любой подходящий режим дозирования. Разовая дозировка включает от 0,1 до 1 мг. Лечение может быть однократным или может повторяться множество раз, например каждые 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, еженедельно, раз в две недели или ежемесячно. Модифицированные полипептиды MTSP-1 могут быть модифицированы, например, путем ПЭГилирования или мультимеризации для увеличения периода полураспада или повышения биодоступности.

Предусмотрены применения модифицированных полипептидов MTSP-1 и/или способов лечения глазного расстройства или офтальмологического расстройства путем введения модифицированного полипептида MTSP-1, представленного в настоящем документе, такого как системное введение или введение в глаз. Офтальмологические расстройства включают диабетическую ретинопатию и дегенерацию желтого пятна, такие как AMD. Подходящие дозировки могут быть определены эмпирически и включают однократную дозу, которая составляет от 0,1 до 1 мг. Примерами модифицированных полипептидов MTSP-1 для применения по этим показаниям являются любые представленные здесь, которые расщепляют C3. Такие примеры включают модифицированные полипептиды MTSP-1, содержащие последовательность аминокислотных остатков, указанную в любой из SEQ ID NO: 35 и 42, или их каталитически активную часть, такие как, без ограничения, модифицированный полипептид MTSP-1, который содержит замены или вставки и/или делеции: Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D или Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/G151H/Q175L/Q192D или модифицированный полипептид MTSP-1, содержащий замены: I41D/G151N/Q192T или I41D/C122S/G151N/Q192T. Полипептиды можно вводить в глаз, как описано выше, например, путем интравитреальной инъекции или другим локальным способом. Лечение может быть однократным или повторяться множество раз, например каждые 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, каждые 6 дней, еженедельно, раз в две недели или ежемесячно.

Модифицированные полипептиды MTSP-1 включают полипептиды с последовательностью SEQ ID NO: 35 или их каталитически активную часть, или полноразмерные формы или их каталитически активные части. Модифицированные

полипептиды MTSP–1 могут быть модифицированы, например, путем ПЭГилирования или мультимеризации для увеличения периода полураспада или повышения биодоступности.

Для любого применения, модифицированный полипептид MTSP–1 может быть представлен в форме одно– или двухцепочечного модифицированного полипептида MTSP–1 или в форме зимогена, которая активируется *in vivo*. Протеазные домены активны как одиночные цепи. Модифицированные полипептиды MTSP–1 могут включать другие модификации, такие как ПЭГилирование, для изменения или улучшения фармакологических свойств.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На рисунке 1 представлен обзор классического, лектинового и альтернативного путей комплемента, а также активация терминального комплекса комплемента, мембраноатакующего комплекса (МАК). На рисунке изображены многие из более чем 30 белков, которые участвуют в каскаде комплемента, а также изображено их действие в каскаде и точки их пересечения между путями комплемента. Например, все три пути сходятся при образовании C3–конвертазы, которая расщепляет C3 с образованием C5–конвертазы, приводящей к образованию комплекса МАК. На рисунке также изображено образование многих продуктов расщепления комплемента.

РАСКРЫТЫЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Перечень разделов

A. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

B. СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ MTSP–1

1. Сериновые протеазы

2. Структура

3. Функция/Активность

V. ИНГИБИРОВАНИЕ КОМПЛЕМЕНТА ПОСРЕДСТВОМ НАЦЕЛИВАНИЯ

НА C3

1. Белок C3 комплемента и его роль в инициации комплемента

а. Классический Путь

б. Альтернативный путь

в. Лектиновый путь

г. Опосредованные комплементом эффекторные функции

i. Опосредованный комплементом лизис: мембраноатакующий комплекс

ii. Воспаление

iii. Хемотаксис

iv. Опсонизация

v. Активация гуморального иммунного ответа

2. Структура и функции C3

а. C3a

б. C3b

в. Ингибиторы C3b

Г. МОДИФИЦИРОВАННЫЕ

ПОЛИПЕПТИДЫ

MTSP–1,

РАСЩЕПЛЯЮЩИЕ C3

1. Типичные модифицированные полипептиды MTSP–1

2. Дополнительные модификации

а. Снижение иммуногенности

б. Fc домены

в. Конъюгация до полимеров

г. Домены белковой трансдукции

Д. АНАЛИЗЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ И/ЛИ МОНИТОРИНГА АКТИВНОСТИ MTSP-1 В ОТНОШЕНИИ ФУНКЦИЙ, ОПОСРЕДОВАННЫХ КОМПЛЕМЕНТОМ

1. Методы оценки активности и специфичности MTSP-1 для расщепления белка C3 комплемента для его инактивации

а. Обнаружение белка

i. SDS-PAGE анализ

ii. Иммуноферментный анализ

iii. Радиальная иммунодиффузия (РИД)

б. Гемолитические тесты

с. Методы определения сайтов расщепления

2. Методы оценки активности MTSP-1 дикого типа

а. Расщепление субстратов MTSP-1

б. Анализы связывания MTSP-1 с субстратом

с. Анализы расщепления C3

3. Специфичность

4. Модели заболеваний

Е. СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, КОДИРУЮЩИХ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ MTSP-1

1. Выделение или получение нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды MTSP-1

2. Генерация мутантных или модифицированных нуклеиновых кислот и кодирующих полипептидов

3. Векторы и клетки

4. Экспрессия

а. Прокариотические клетки

б. Дрожжевые клетки

в. Насекомые и клетки насекомых

г. Млекопитающие

д. Растения

5. Очистка

6. Дополнительные модификации

а. ПЭГилирование

б. Слитые белки

7. Молекулы нуклеиновых кислот

Ж. КОМПОЗИЦИИ, СОСТАВЫ И ДОЗИРОВКИ

1. Введение модифицированных полипептидов MTSP-1

2. Введение нуклеиновых кислот, кодирующих модифицированные полипептиды MTSP-1 (генная терапия)

3. ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ И МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ

1. Заболевание, опосредованное активацией комплемента

а. Ревматоидный артрит

б. Сепсис

в. Рассеянный склероз

г. Болезнь Альцгеймера

д. Синдром ишемии-реперфузии

е. Нарушения зрения

Возрастная макулярная дегенерация (AMD)

ж. Трансплантация органов и отсроченная функция трансплантата (DGF)**2. Терапевтическое применение****а. Иммуноопосредованные воспалительные заболевания****б. Нейродегенеративное заболевание****в. Сердечно-сосудистое заболевание****г. Возрастная макулярная дегенерация (AMD)****д. Трансплантация органа****Отсроченная функция трансплантата (DGF)****3. Комбинированная терапия****И. ПРИМЕРЫ****А. ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится изобретение(я). Все патенты, патентные заявки, опубликованные заявки и публикации, последовательности GENBANK, веб-сайты и другие опубликованные материалы, на которые есть ссылки во всем раскрытии настоящего документа, если не указано иное, включены в качестве ссылки во всей их полноте. В случае если в данном документе существует множество определений терминов, они приводятся в этом разделе. Когда в настоящем документе делается ссылка на URL-адрес или другой такой идентификатор или адрес, подразумевается, что такие идентификаторы могут изменяться и конкретная информация в Интернете может приходить и уходить, но эквивалентная информация известна и может быть легко доступна, например, путем поиска в Интернете и/или соответствующих базах данных. Ссылка на подобные источники свидетельствует о наличии и публичном распространении такой информации.

Используемый в настоящем документе термин «расщепление» относится к разрыву пептидных связей протеазой.

Мотив сайта расщепления для протеазы включает N- и C-концевые остатки в расщепляющейся связи (непраймированные и праймированные стороны, соответственно, с сайтом расщепления для протеазы, определяемой как ... P3-P2-P1-P1'-P2'-P3', где расщепление происходит между остатками P1 и P1'). В человеческом C3 расщепление C3-конвертазой происходит между остатками R и S (см. Остатки 746-751 в SEQ ID NO: 9, расщепление между 748 и 749 остатками последовательности в человеческом C3) C3:

P3 P2 P1 P1' P2' P3'

Leu Ala Arg ↓ Ser Asn Leu.

Как правило, расщепление субстрата в биохимическом пути представляет собой активационное расщепление или ингибирующее расщепление. Активационное расщепление относится к расщеплению полипептида из неактивной формы в активную

форму. Это включает, например, расщепление зимогена до активного фермента. Активационное расщепление также представляет собой расщепление, при котором белок расщепляется на один или несколько белков, которые сами обладают активностью. Например, система комплемента представляет собой необратимый каскад событий протеолитического расщепления, окончание которого приводит к образованию множества эффекторных молекул, которые стимулируют воспаление, облегчают фагоцитоз антигена и непосредственно лизируют некоторые клетки. Таким образом, расщепление C3-конвертазой белка C3 на C3a и C3b является активационным расщеплением. Напротив, модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, осуществляют ингибирующее расщепление C3, например, путем расщепления в целевом сайте, что приводит к инактивации C3.

Как используется в настоящем документе, ингибирующее расщепление или инактивационное расщепление представляет собой расщепление белка на один или несколько продуктов разложения, которые не являются функционально активными. Ингибирующее расщепление приводит к уменьшению или подавлению активности белка.

Как правило, подавление активности белка подавляет (ослабляет) путь или процесс, в который вовлечен белок. В одном примере расщепление любого одного или нескольких из белков комплемента, которое представляет собой ингибирующее расщепление, приводит к сопутствующему подавлению или ингибированию любого одного пути или нескольких путей из классического, лектинового или альтернативного функциональных путей комплемента. Ингибирующим считается расщепление, которое снижает активность, по меньшей мере на или по меньшей мере приблизительно на 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%), 90 %), 95%), 99% или более по сравнению с нативной формой белка. Процент расщепления белка, который требуется для ингибирующего расщепления, варьируется среди белков, но может быть определен путем анализа активности белка.

Используемый в настоящем документе термин «активация комплемента» относится к активации путей комплемента, например, активация комплемента относится к увеличению функций или активностей любого одного или нескольких из путей комплемента под действием протеазы или увеличению активности любого из белков в пути комплемента.

Активация комплемента может привести к опосредованному комплементом лизису клеток или может привести к разрушению клеток или тканей. Неправильная активация комплемента на ткани хозяина играет важную роль в патологии многих аутоиммунных и воспалительных заболеваний, а также ответственна за многие болезненные состояния, связанные с биосовместимостью, или связана с ними. Понятно, что активация может

означать увеличение существующей активности, а также индукцию новой активности. Активация комплемента может происходить *in vitro* или *in vivo*. Примерные функции комплемента, которые можно анализировать и которые описаны в данном документе, включают гемолитические анализы и анализы для измерения любой одной или нескольких из эффекторных молекул комплемента, таких как SDS PAGE, с последующим Вестерн-блоттингом или окрашиванием Кумасси бриллиантовым синим или ELISA. В некоторых вариантах осуществления активация комплемента ингибируется протеазой, такой как протеаза, описанная в данном документе, на 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% или более по сравнению с активностью комплемента в отсутствие протеазы.

Используемый в настоящем документе термин «ингибирование активации комплемента» или «инактивация комплемента» относится к уменьшению или подавлению опосредованной комплементом функции или активности любого одного или нескольких из путей комплемента под действием протеазы или активности любого из белков в пути. Функция или активность комплемента может происходить *in vitro* или *in vivo*. Примерные функции комплемента, которые можно анализировать и которые описаны в данном документе, включают гемолитические анализы и анализы для измерения любой одной или нескольких из эффекторных молекул комплемента, таких как SDS PAGE, с последующим Вестерн-блоттингом или окрашиванием Кумасси бриллиантовым синим или ELISA. Протеаза может ингибировать активацию комплемента на 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%), на 90% или более. В других вариантах осуществления активация комплемента ингибируется протеазой на 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% или более по сравнению с активностью комплемента в отсутствие протеазы.

Используемый в настоящем документе термин «белок комплемента» или «компонент комплемента» представляет собой белок системы комплемента, который функционирует для защиты хозяина от инфекций и воспалительного процесса. Белки комплемента включают те, которые функционируют в классическом пути, те, которые функционируют в альтернативном пути, и те, которые функционируют в лектиновом пути. Среди белков комплемента есть протеазы, которые участвуют в путях комплемента. Кроме того, как используется в данном документе, белки комплемента включают любой из «продуктов расщепления» (также называемых «фрагментами»), которые образуются при активации каскада комплемента. В число белков комплемента также входят неактивные или измененные формы белков комплемента, такие как iC3b и C3a-desArg. Таким образом, белки комплемента включают, но не ограничиваются ими: C1q, C1r, C1s, C2, C3, C3a, C3b, C3c, C3dg, C3g, C3d, C3f, iC3, C3a-desArg, C4, C4a, C4b, iC4, C4a-desArg, C5, C5a, C5a-des-Arg, C6, C7, C8, C9, MASP-1, MASP-2, MBL, фактор В, фактор D, фактор H, фактор I,

CR1, CR2, CR3, CR4, ропердин, C11nh, C4bp, MCP, DAF, CD59 (MIRL), кластерин и HRF и аллельные и видовые варианты любого белка комплемента.

Используемый в настоящем документе термин «нативная» форма белка комплемента представляет собой такую форму, которая может быть выделена из организма, такого как позвоночное, в отсутствие активации комплемента, и которая не была преднамеренно изменена человеком в лаборатории. Примеры нативных белков комплемента включают C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, фактор В, фактор D, пропердин, C5, C6, C7, C8 и C9.

Как правило, «нативные белки комплемента» неактивны и приобретают активность при активации. Активация может потребовать активационного расщепления, созревания расщеплением и/или образования комплекса с другими белками. Исключением являются Фактор I и Фактор D, которые обладают ферментативной активностью в своей нативной форме. В некоторых примерах активация нативного белка комплемента происходит после расщепления белка.

Например, зимогены комплемента, такие как C3, представляют собой протеазы, которые сами активируются расщеплением протеазой, таким как расщепление C3 компонента комплемента C3-конвертазой C4b2b приводит к образованию активных фрагментов C3a и C3b. В другом примере расщепление неактивного нативного белка комплемента приводит к изменениям структурной стабильности белка, что приводит к активации белка. Например, C3 содержит внутреннюю тиоэфирную связь, которая в нативном белке стабильна, но может стать очень реактивной и активированной после конформационных изменений, которые возникают в результате расщепления белка.

Таким образом, продукты расщепления C3 являются биологически активными. Активация C3 также может происходить спонтанно при отсутствии расщепления. Именно спонтанное превращение тиоэфирной связи в нативном C3 является иницилирующим событием альтернативного пути комплемента. В других примерах активация нативного белка комплемента происходит после высвобождения комплексной регуляторной молекулы, которая ингибирует активность в ином случае активного нативного белка комплемента. Например, C1inh связывается и инактивирует C1s и C1r, если только они не находятся в комплексе с C1q.

Используемый в настоящем документе термин «созревание расщеплением» является общим термином, который относится к любому расщеплению, необходимому для активации зимогена. Указанный термин включает в себя расщепление, которое приводит к конформационному изменению, приводящему к активности (т.е. активационное расщепление). Он также включает расщепление, при котором обнажается критический сайт

связывания, обнажается стерическое препятствие или удаляется или перемещается ингибирующий сегмент.

Используемый в настоящем документе термин «измененная форма» белка комплемента относится к белку комплемента, который присутствует в ненативной форме в результате модификаций его молекулярной структуры. Например, реакция C3 сложного тиоэфира с водой может происходить в отсутствие расщепления конвертазы, давая гидролизованную неактивную форму C3, называемую iC3. В другом примере анафилатоксины, включая C3a, C5a и C4a, могут быть дезаргинированы карбоксипептидазой N в более стабильные и менее активные формы.

Используемый в настоящем документе термин «фрагмент» или «продукт расщепления» белка комплемента представляет собой область или сегмент белка комплемента, который содержит часть полипептидной последовательности нативного белка комплемента. Фрагмент белка комплемента обычно образуется после активации каскада комплемента. Обычно фрагмент является результатом протеолитического расщепления нативного белка комплемента. Например, белок C3 комплемента ферментативно расщепляется C3-конвертазой, что приводит к образованию двух фрагментов: C3a, который составляет N-концевую часть C3; и C3b, который составляет C-концевую часть и содержит сайт сериновой протеазы. Фрагмент белка комплемента также является результатом протеолитического расщепления другого фрагмента белка комплемента. Например, фрагмент C3b, полученный в результате расщепления C3, расщепляется Фактором I с образованием фрагментов iC3b и C3f. Обычно продукты расщепления белков комплемента являются биологически активными продуктами и функционируют как расщепленные эффекторные молекулы расщепления системы комплемента. Следовательно, фрагмент или часть белка комплемента включает продукты расщепления белков комплемента, а также части белков, которые сохраняют или проявляют по меньшей мере одну активность белка комплемента.

Используемый в настоящем документе термин «расщепленные эффекторные молекулы» или «расщепленные эффекторные белки» относится к активным продуктам расщепления, образующимся в результате каскада триггерных ферментов системы комплемента. Расщепленная эффекторная молекула, фрагмент или продукт расщепления, полученные в результате активации комплемента, могут вносить вклад в любую из одной или нескольких опосредованных комплементом функций или активностей, которые включают опсонизацию, анафилаксию, лизис клеток и воспаление. Примеры расщепленных или эффекторных молекул включают, но не ограничиваются ими, C3a, C3b, C4a, C4b, C5a, C5b-9 и Bb. Расщепленные эффекторные молекулы системы комплемента, в

силу своего участия в каскаде, проявляют активность, которая включает стимуляцию воспаления, облегчение фагоцитоза антигенов и непосредственный лизис некоторых клеток. Продукты расщепления комплемента способствуют активации или участвуют в активации путей комплемента.

Используемый в настоящем документе термин «анафилатоксины» представляет собой эффекторные белки расщепления, которые запускают дегрануляцию или высвобождение веществ из тучных клеток или базофилов и участвуют в воспалительном ответе, особенно в качестве защиты от паразитов. Если дегрануляция слишком сильная, это может вызвать аллергические реакции.

Анафилатоксины включают, например, C3a, C4a и C5a. Анафилатоксины также косвенно опосредуют спазмы клеток гладких мышц (например, бронхоспазмы), увеличение проницаемости кровеносных капилляров и хемотаксис.

Используемый в настоящем документе термин «хемотаксис» относится к опосредованному рецептором движению лейкоцитов к хемоаттрактанту, как правило, в направлении увеличения его концентрации, например в направлении увеличения концентрации анафилатоксина.

Используемый в настоящем документе термин «опсонизация» относится к изменению поверхности патогена или другой частицы, так что она может проглатываться фагоцитами. Белок, который связывает или изменяет поверхность патогена, называется опсонином. Белки антител и комплемента опсонизируют внеклеточные бактерии для поглощения и разрушения фагоцитами, такими как нейтрофилы и макрофаги.

Используемый здесь термин «лизис клеток» относится к разрушению клетки путем разрушения ее стенки или мембраны. Гемолиз эритроцитов это измерение лизиса клеток.

Используемый в настоящем документе термин «белок C3 комплемента» или «C3 белок комплемента» или «C3» относится к белку C3 системы комплемента, который функционирует для защиты хозяина от инфекций и воспалительного процесса. Белок C3 человека представляет собой одноцепочечный пре-пробелок или зимоген, состоящий из 1663 аминокислот и представленный в SEQ ID NO: 9. C3 содержит сигнальный пептид из 22 аминокислот (аминокислоты 1–22 в SEQ ID NO: 9) и тетра-аргининовую последовательность (аминокислоты 668–671 в SEQ ID NO: 9), которая удаляется фуриноподобным ферментом, что приводит к образованию зрелого двухцепочечного белка, содержащего бета-цепь (аминокислоты 23–667 в SEQ ID NO: 9) и альфа-цепь (аминокислоты 672–1663 в SEQ ID NO: 9), связанные дисульфидной связью между остатками C559 и C816. Белок C3 комплемента дополнительно активируется

протеолитическим расщеплением C3-конвертазой (C4b2b или C3bBb) между 748 и 749 аминокислотами в SEQ ID NO: 9 с образованием анафилатоксина C3a и опсонина C3b.

Используемый в настоящем документе термин «зимоген» относится к белку, который активируется протеолитическим расщеплением, включая созревание расщеплением, такое как активационное расщепление, и/или образование комплекса с другим белком (белками) и/или кофактором (кофакторами). Зимоген является неактивным предшественником белка. Такие предшественники обычно больше, чем активная форма, хотя и не обязательно. Что касается MTSP-1 или белка C3 комплемента, зимогены превращаются в активные ферменты путем специфического расщепления, включая каталитическое и автокаталитическое расщепление, или путем связывания активационного кофактора, который генерирует активный фермент. Таким образом, зимоген представляет собой ферментативно неактивный белок, который под действием активатора превращается в протеолитический фермент. Расщепление может быть осуществлено автокаталитически. Ряд белков комплемента представляет собой зимогены; они неактивны, но расщепляются и активируются при инициации системы комплемента после заражения. Зимогены, как правило, неактивны и могут превращаться в зрелые активные полипептиды путем каталитического или автокаталитического отщепления прорегиона от зимогена.

Используемые в настоящем документе термины «прорегион», «пропептид» или «пропоследовательность» относятся к области или сегменту белка, который расщепляется для получения зрелого белка. Данный термин может включать сегменты, которые функционируют для подавления ферментативной активности путем маскировки каталитического механизма и, таким образом, предотвращения образования промежуточного каталитического соединения (т.е. путем стерического окклюзирования сайта связывания субстрата). Прорегион представляет собой последовательность аминокислот, расположенных на амино-конце (N-конце) зрелого биологически активного полипептида, и может состоять всего из нескольких аминокислот или может иметь многодоменную структуру.

Используемый в настоящем документе термин «последовательность активации» или «активационная последовательность» относится к последовательности аминокислот в зимогене, которая является сайтом, необходимым для активационного расщепления или созревания расщеплением с образованием активной протеазы. Расщепление последовательности активации может быть катализировано автокаталитически или партнерами активации.

Активационное расщепление представляет собой тип созревания расщеплением, при котором происходит конформационное изменение, необходимое для появления

активности. Это классический путь активации, например, для сериновых протеаз, в которых при расщеплении образуется новый N-конец, взаимодействующий с консервативными участками каталитического механизма, такими как каталитические остатки, чтобы вызвать конформационные изменения, необходимые для появления активности. Активация может привести к образованию многоцепочечных форм протеаз. В некоторых случаях одноцепочечные формы протеазы могут проявлять протеолитическую активность.

Используемый в настоящем документе термин «домен» относится к части молекулы, такой как белки или кодирующие нуклеиновые кислоты, которая структурно и/или функционально отличается от других частей молекулы и является идентифицируемой. Типичный полипептидный домен представляет собой часть полипептида, которая может образовывать независимо свернутую структуру в полипептиде, состоящем из одного или нескольких структурных мотивов (например, комбинаций альфа-спиралей и/или бета-тяжей, связанных областями петли), и/или которая распознается определенной функциональной активностью, такой как ферментативная активность, димеризация или связывание с субстратом. Полипептид может иметь один или несколько, обычно более одного, разных доменов. Например, полипептид может иметь один или несколько структурных доменов и один или несколько функциональных доменов. Один полипептидный домен можно различить на основе структуры и функции. Домен может охватывать непрерывную линейную последовательность аминокислот. Альтернативно, домен может охватывать множество не прилегающих друг к другу (несмежных) аминокислотных участков, которые не являются смежными по всей длине линейной последовательности аминокислот в полипептиде. Как правило, полипептид содержит множество доменов. Например, сериновые протеазы могут быть охарактеризованы на основе последовательности домена(ов) протеазы. Специалисты в данной области знакомы с полипептидными доменами и могут идентифицировать их в силу структурной и/или функциональной гомологии с другими такими доменами. Для пояснения здесь даны определения, но понятно, что в данной области техники хорошо распознавать конкретные домены по названию. При необходимости можно использовать соответствующее программное обеспечение для идентификации доменов.

Используемый здесь термин «структурная область» полипептида представляет собой область полипептида, которая содержит по меньшей мере один структурный домен.

Используемый в настоящем документе термин «протеазный домен» представляет собой каталитически активную часть протеазы. Ссылка на протеазный домен протеазы включает в себя одно-, двух- и многоцепочечные формы любого из этих белков.

Протеазный домен белка содержит все необходимые свойства этого белка, необходимые для его протеолитической активности, такие как, например, его каталитический центр.

Используемый здесь термин «каталитически активная часть» или «каталитически активный домен» протеазы, например полипептида MTSP-1, относится к протеазному домену или любому его фрагменту или части, которая сохраняет активность протеазы. Например, каталитически активная часть полипептида MTSP-1 может представлять собой протеазный домен MTSP-1, включая выделенную одноцепочечную форму протеазного домена или активированную двухцепочечную форму. Зимогенная форма каждого белка представляет собой одноцепочечную форму, которая может быть преобразована в активную двухцепочечную форму путем расщепления. Протеазный домен также может быть преобразован в двухцепочечную форму. Существенно, что, по крайней мере, *in vitro*, одноцепочечные формы протеаз и каталитических доменов или их протеолитически активных частей (обычно усечением С-конца) проявляют протеазную активность.

Используемый в настоящем документе термин «нуклеиновая кислота, кодирующая протеазный домен или каталитически активную часть протеазы» относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей только указанный одноцепочечный протеазный домен или его активную часть, а не к другим смежным частям протеазы в качестве непрерывной последовательности.

Используемая в настоящем документе декларация того, что полипептид состоит по существу из протеазного домена, означает, что единственная часть полипептида представляет собой протеазный домен или его каталитически активную часть. Полипептид может включать и, как правило, будет включать дополнительные непротеазные последовательности аминокислот.

Используемый в настоящем документе термин «активный сайт протеазы» относится к сайту связывания субстрата, где происходит катализ субстрата. Структура и химические свойства активного сайта позволяют распознавать и связывать субстрат с последующим гидролизом и расщеплением соответствующей связи в субстрате. Активный сайт протеазы содержит аминокислоты, которые способствуют каталитическому механизму расщепления пептидов, а также аминокислоты, которые способствуют узнаванию субстратной последовательности, такие как аминокислоты, которые способствуют повышенной специфичности связывания субстрата.

Как используется в настоящем документе, целевой сайт в C3 относится к сайту, который после расщепления инактивирует C3. Примером такого сайта является:

Q H A R ↓ A S H L (остатки 737–744 в SEQ ID NO: 9)

P4P3P2P1 ↓ P1' P4'.

Используемый в настоящем документе термин «сайт распознавания субстрата» или «последовательность расщепления» относится к последовательности, распознаваемой активным сайтом протеазы, которая затем расщепляется протеазой. Как правило, последовательность расщепления для сериновой протеазы составляет шесть аминокислотных остатков в длину, чтобы соответствовать повышенной субстратной специфичности многих протеаз, но может быть длиннее или короче, в зависимости от протеазы. Как правило, например, для сериновой протеазы последовательность расщепления в субстрате состоит из аминокислот P1–P4 и P1'–P4, где расщепление происходит между положениями P1 и P1'.

Используемый в настоящем документе термин «целевой субстрат» относится к субстрату, который расщепляется протеазой. Как правило, целевой субстрат специфически расщепляется протеазой в своем сайте распознавания субстрата. Как минимум, целевой субстрат включает аминокислоты, которые составляют последовательность расщепления. Необязательно, целевой субстрат включает пептид, содержащий последовательность расщепления и любые другие аминокислоты. Белок полной длины, аллельный вариант, изоформа или любая их часть, содержащая последовательность расщепления, распознаваемую протеазой, является целевым субстратом для этой протеазы. Например, для целей настоящего документа, в которых предполагается инактивация комплемента, целевым субстратом является белок C3 комплемента или любая его часть или фрагмент, содержащие последовательность расщепления, распознаваемую полипептидом MTSP–1. Такие целевые субстраты могут представлять собой очищенные белки или могут присутствовать в смеси, такой как смесь *in vitro* или смесь *in vivo*. Смеси могут включать, например, кровь или сыворотку, или грудное молоко, или другие тканевые жидкости. Кроме того, целевой субстрат включает пептид или белок, содержащий дополнительный фрагмент, который не влияет на расщепление субстрата протеазой. Например, целевой субстрат может включать пептид из четырех аминокислот или полноразмерный белок, химически связанный с флуорогенным фрагментом. Протеазы могут быть модифицированы для проявления большей специфичности по отношению к целевому субстрату.

Используемый в настоящем документе термин «MTSP–1» или «MTSP1» или «сериновая протеаза мембранного типа», «полипептид MTSP–1» относится к любому полипептиду MTSP–1, включая, но не ограничиваясь этим, полипептид, полученный рекомбинантным путем, синтетически полученный полипептид и полипептид MTSP–1, извлеченный или экстрагированный или выделенный из клеток или тканей, включая, но не ограничиваясь этим, эпителиальные клетки, раковые клетки, печень и кровь.

Альтернативные названия, которые взаимозаменяемо используются для MTSP-1, включают сериновую протеазу и матриптазу мембранного типа, а также эпитин и TMPRSS1 и белок-супрессор онкогенности 14, простамин и сериновую протеазу 14 (ST14) и сериновую протеазу TADG-15 и ассоциированный с опухолью дифференциально-экспрессируемый геном 15 (TADG-15) белок. MTSP-1 включает родственные полипептиды из разных видов, включая, но не ограничиваясь ими, животных человеческого и нечеловеческого происхождения. MTSP-1 человека включает MTSP-1, аллельные варианты, изоформы, синтетические молекулы из нуклеиновых кислот, белок, выделенный из ткани и клеток человека, и их модифицированные формы.

Типичные немодифицированные полипептиды MTSP-1 человека включают, но не ограничиваются этим, немодифицированные полипептиды MTSP-1 дикого типа (SEQ ID NO: 1) и протеазный домен (такой как одноцепочечный протеазный домен MTSP-1, приведенный в SEQ ID NO: 2). Специалист в данной области должен признать, что приведенный полноразмерный полипептид MTSP-1 дикого типа (SEQ ID NO: 1) отличается на 614 аминокислотных остатков от протеазного домена MTSP-1 (SEQ ID NO: 2). Таким образом, первый аминокислотный остаток в SEQ ID NO: 2 «соответствует» шестисот пятнадцатому (615-му) аминокислотному остатку в SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления полипептид MTSP-1 может представлять собой любой один или несколько аллельных вариантов MTSP-1, как указано в SEQ ID NO: 99.

Протеаза MTSP-1 встречается в виде одноцепочечного зимогена и в виде активированного двухцепочечного полипептида. Ссылка на MTSP-1 включает его активные одноцепочечные и двухцепочечные формы. Полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, могут быть дополнительно модифицированы, например, путем химической модификации или посттрансляционной модификации. Такие модификации включают, но не ограничиваются ими, гликозилирование, ПЭГилирование, альбуминирование, фарнезилирование, карбоксилирование, гидроксилирование, фосфорилирование, ГЭКирирование, ПАСилирование и другие модификации полипептидов, известные в данной области.

MTSP-1 включает MTSP-1 из любых видов, включая человеческие и нечеловеческие виды. Полипептиды MTSP-1 не человеческого происхождения включают, но не ограничиваются этим, полипептиды MTSP-1 мыши и крысы. Типичные полипептиды MTSP-1 нечеловеческого происхождения включают, например, мышь (*Mus musculus*, SEQ ID NO: 12) и крысу (*Rattus norvegicus*, SEQ ID NO: 13).

Ссылка на полипептиды MTSP-1 также включает полипептиды-предшественники и зрелые полипептиды MTSP-1 в одноцепочечных или двухцепочечных формах, их

укороченные формы, которые обладают активностью, выделенный протеазный домен и включает аллельные варианты и видовые варианты, а также варианты, кодируемые вариантами сплайсинга и другие варианты, включая полипептиды, которые имеют по меньшей мере или по меньшей мере около 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96% , 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности к полноразмерной форме (SEQ ID NO: 1 или 3) или протеазному домену (SEQ ID NO: 2 или 4). Полипептиды MTSP-1 включают, но не ограничиваются ими, тканеспецифические изоформы и их аллельные варианты, синтетические молекулы, полученные путем трансляции нуклеиновых кислот, белки, полученные химическим синтезом, таким как синтез, который включает лигирование более коротких полипептидов посредством рекомбинантных методов, белки, выделенные из тканей и клеток человека и не человека, химерные полипептиды MTSP-1 и их модифицированные формы. Полипептиды MTSP-1 также включают фрагменты или части MTSP-1, которые имеют достаточную длину или включают соответствующие области для сохранения по меньшей мере одной активности (при активации, если необходимо) полноразмерного зрелого полипептида. В одном примере часть MTSP-1 представляет собой протеазный домен, такой как, например, протеазный домен, указанный в SEQ ID NO: 2, который соответствует аминокислотам 615–855 в последовательности MTSP-1 дикого типа (WT), указанной в SEQ ID NO: 1. Полипептиды MTSP-1 также включают полипептиды, которые содержат химические или посттрансляционные модификации и те полипептиды, которые не содержат химических или посттрансляционных модификаций. Такие модификации включают, но не ограничиваются ими, ПЭГилирование, альбуминирование, гликозилирование, фарнезилирование, карбоксилирование, гидроксилирование, фосфорилирование, ГЭКирирование, ПАСилирование и другие модификации полипептидов, известные в данной области.

Используемый в данном документе термин «протеаза MTSP-1» или «протеазный домен MTSP-1» или «протеазный домен MTSP-1» относится к любому полипептиду MTSP-1, включая, но не ограничиваясь этим, полипептид, полученный рекомбинантным путем, синтетически полученный полипептид и полипептид MTSP-1, экстрагированный или выделенный из клеток или тканей, включая, но не ограничиваясь этим, печень и кровь. Протеаза MTSP-1 включает родственные полипептиды из разных видов, включая, но не ограничиваясь ими, животных человеческого и нечеловеческого происхождения. Протеаза MTSP-1 человека или протеазный домен MTSP-1 человека включает MTSP-1, аллельные варианты, изоформы, синтетические молекулы из нуклеиновых кислот, белок, выделенный из ткани и клеток человека, и их модифицированные формы. Типичные эталонные домены

протеазы MTSP-1 человека включают, но не ограничиваются ими, немодифицированный протеазный домен MTSP-1 дикого типа (SEQ ID NO: 2) и альтернативный протеазный домен (такой как протеазный домен MTSP-1, указанный в SEQ ID NO: 4). Специалист в данной области должен признать, что указанные позиции протеазного домена MTSP-1 (SEQ ID NO: 2) отличаются на 614 аминокислотных остатков по сравнению с полноразмерным полипептидом MTSP-1 (SEQ ID NO: 1), который представляет собой полипептид MTSP-1, содержащий полноразмерную последовательность дикого типа. Таким образом, первый аминокислотный остаток в SEQ ID NO: 2 «соответствует» шестисот пятнадцатому (615-му) аминокислотному остатку в SEQ ID NO: 1.

Используемый в настоящем документе термин «модификация» относится к модификации аминокислотной последовательности полипептида или последовательности нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты и включает делеции, вставки и замены аминокислот или нуклеотидов соответственно. Модифицированные полипептиды MTSP-1 относятся к полипептидам MTSP-1, содержащим изменения в первичной последовательности полипептида. Способы модификации полипептида являются обычными для специалистов в данной области техники, например, с использованием методов рекомбинантных ДНК. Ссылка на другие модификации, такие как посттрансляционные модификации, и конъюгирование с фрагментами, такими как полимеры, такими как фрагменты ПЭГ, а также на различные tag для детекции или выделения, указана как таковая.

Используемый в настоящем документе термин «замена» или «замещение» относится к замене одного или более нуклеотидов или аминокислот в нативной, целевой, в последовательности дикого типа или в другой последовательности нуклеиновой кислоты или полипептида на альтернативный нуклеотид или аминокислоту без изменения длины (при ее указании в количестве соответствующих остатков) молекулы. Таким образом, одна или более замен в молекуле не изменяют количество аминокислотных остатков или нуклеотидов молекулы. Аминокислотные замены по сравнению с конкретным полипептидом могут быть выражены через количество аминокислотных остатков по всей длине полипептидной последовательности. Например, модифицированный полипептид, имеющий модификацию аминокислоты в 35-м положении аминокислотной последовательности, которая представляет собой замену/замещение аргинина (Arg; R) на глутамин (Gln; Q), может быть выражен как R35Q, Arg35Gln, или 35Q. Просто R35 можно использовать, чтобы указать, что аминокислота в модифицированной 35-й позиции представляет собой аргинин.

Используемый в настоящем документе термин «модифицированный MTSP-1» или «модифицированный полипептид MTSP-1» относится к протеазе MTSP-1, которая проявляет измененную активность, такую как измененная специфичность к субстрату, по сравнению с немодифицированной формой. Такие протеазы включают 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более модификаций (т.е. изменений в аминокислотах) по сравнению с MTSP-1 дикого типа, таких что изменяется активность, такая как субстратная специфичность или селективность, протеазы MTSP-1 в отношении расщепления белка C3 комплемента. Модифицированный MTSP-1 может представлять собой полноразмерную протеазу MTSP-1 или может быть частью полноразмерной протеазы, такой как протеазный домен MTSP-1, при условии, что модифицированная протеаза MTSP-1 содержит такие модификации, которые изменяют активность или субстратную специфичность протеазы и при этом протеаза является протеолитически активной. Модифицированная протеаза MTSP-1 или модифицированный протеазный домен MTSP-1 также может включать другие модификации, которые не влияют на субстратную специфичность протеазы. Следовательно, модифицированный полипептид MTSP-1 обычно имеет 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % или более идентичности последовательности с соответствующей аминокислотной последовательностью полипептида MTSP-1 дикого типа. Модифицированный полноразмерный полипептид MTSP-1 или его каталитически активная часть или его протеазный домен может включать полипептиды, которые являются слитыми белками, при условии, что слитый белок обладает целевой специфичностью.

Как используется в настоящем документе, «нумерация по химотрипсину» или «химотрипсиновая нумерация» относится к нумерации аминокислот зрелого полипептида химотрипсина в SEQ ID NO: 1. Протеазный домен другой протеазы, например, такой как протеазный домен MTSP-1 может быть выравнен с протеазным доменом химотрипсина. При этом аминокислотные остатки MTSP-1, соответствующие аминокислотным остаткам химотрипсина, будут иметь аналогичную нумерацию аминокислот, что и в химотрипсине. Соответствующие положения аминокислот могут быть определены специалистом в данной области техники с использованием ручного выравнивания или с использованием многочисленных доступных программ выравнивания последовательностей (например, BLASTP). Соответствующие положения также могут быть основаны на структурных выравниваниях, например, с использованием компьютерных симуляций выравнивания структуры белка. Признание того, что аминокислоты полипептида соответствуют аминокислотам в раскрытой последовательности, относится к аминокислотам, идентифицированным при выравнивании полипептида с раскрытой последовательностью,

чтобы максимизировать идентичность или гомологию (где консервативные аминокислоты выравниваются) с использованием стандартного алгоритма выравнивания, такого как алгоритм GAP. В таблице 1 приведена соответствующая нумерация по химотрипсину для аминокислот полипептида MTSP-1 в положениях 615–855, указанных в SEQ ID NO: 1. Положения аминокислот относительно последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, выделены обычным шрифтом, аминокислотные остатки в этих положениях выделены жирным шрифтом, а положения аминокислот в соответствии с химотрипсиновой нумерацией выделены курсивом. Например, после выравнивания домена сериновой протеазы MTSP-1 (SEQ ID NO: 2) со зрелым химотрипсином, остатку V в положении 1 в домене протеазы MTSP-1 присваивается номер V16 по химотрипсину. Последующие аминокислоты нумеруются соответственно. В одном примере F в положении аминокислоты 708 полноразмерного MTSP-1 (SEQ ID NO: 1) или в положении 94 протеазного домена MTSP-1 (SEQ ID NO: 2) соответствует F99 по нумерации химотрипсина. Если остаток существует в протеазе, но отсутствует в химотрипсине, аминокислотному остатку присваивается буквенное обозначение. Например, остатки в химотрипсине, которые являются частью петли с аминокислотой 60 на основе химотрипсиновой нумерации, но вставлены в последовательность MTSP-1 по сравнению с химотрипсином, упоминаются, например, как D60b или R60c. Эти остатки соответствуют D661 и R662 соответственно по нумерации относительно зрелой последовательности MTSP-1 (человека), указанной в SEQ ID NO: 1.

Таблица 1. Нумерация аминокислотных остатков MTSP-1 по химотрипсину (химотрипсиновая нумерация).

615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629
V	V	G	G	T	D	A	D	E	G	E	W	P	W	Q
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644
V	S	L	H	A	L	G	Q	G	H	I	C	G	A	S
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659
L	I	S	P	N	W	L	V	S	A	A	H	C	Y	I
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674
D	D	R	G	F	R	Y	S	D	P	T	Q	W	T	A
60a	60b	60c	60d	60e	60f	60g	60h	60i	61	62	63	64	65	66
675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689
F	L	G	L	H	D	Q	S	Q	R	S	A	P	G	V
67	68	69	70	71	72	73	74	74a	75	76	77	78	79	80
690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704
Q	E	R	R	L	K	R	I	I	S	H	P	F	F	N
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95
705	706		707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718
D	F		T	F	D	Y	D	I	A	L	L	E	L	E
96	97	97a	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109
719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733
K	P	A	E	Y	S	S	M	V	R	P	I	C	L	P
110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124
734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748
D	A	S	H	V	F	P	A	G	K	A	I	W	V	T
	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139
749	750	751	752	753	754	755	756	757		758	759	760	761	762
G	W	G	H	T	Q	Y	G	G		T	G	A	L	I
140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154
763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777
L	Q	K	G	E	I	R	V	I	N	Q	T	T	C	E
155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169
778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792
N	L	L	P	Q	Q	I	T	P	R	M	M	C	V	G
170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184
793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807
F	L	S	G	G	V	D	S	C	Q	G	D	S	G	G
184a	185	186	186a	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197
808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822
P	L	S	S	V	E	A	D	G	R	I	F	Q	A	G
198	199	200	201	202	203	204	204a	205	206	207	208	209	210	211
823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837
V	V	S	W	G	D	G	C	A	Q	R	N	K	P	G
212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226
838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852
V	Y	T	R	L	P	L	F	R	D	W	I	K	E	N
227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241
853	854	855												
T	G	V												
242	243	244												

Как используется в настоящем документе, k_{cat} представляет собой меру каталитической активности фермента, где единицы измерения k_{cat} представляют собой секунды⁻¹. Обратная величина k_{cat} – это время, необходимое молекуле фермента для «оборота» одной молекулы субстрата; k_{cat} измеряет количество молекул субстрата, преобразованных молекулой фермента в секунду. k_{cat} также называется числом оборотов.

Как используется в настоящем документе, специфичность для целевого субстрата относится к предпочтению расщепления целевого субстрата протеазой по сравнению с другим субстратом, называемым нецелевым субстратом. Специфичность отражается в константе специфичности (k_{cat}/K_m), которая является мерой сродства протеазы к ее субстрату и эффективности фермента. k_{cat}/K_m – показатель эффективности фермента; большое значение k_{cat} (быстрый оборот) или небольшое значение K_m (высокое сродство к субстрату) составляет k_{cat}/K_{mlarge} .

Как используется в настоящем документе, константа специфичности для расщепления представляет собой (k_{cat}/K_m), где K_m представляет собой константу Михаэлиса–Ментона ($[S]$ при половине V_{max}), а k_{cat} представляет собой $V_{max}/[E_T]$, где E_T представляет собой конечную концентрацию фермента. Параметры k_{cat} , K_m и k_{cat}/K_m могут быть рассчитаны путем построения графика зависимости обратной концентрации субстрата от обратной скорости расщепления субстрата и подгонки к уравнению Линевера–Бёрка ($1/\text{скорость} = (K_m/V_{max}) (1/[S]) + 1/V_{max}$; где $V_{max} = [E_T]k_{cat}$). Любой метод определения скорости увеличения расщепления во времени в присутствии различных концентраций субстрата может быть использован для расчета константы специфичности. Например, субстрат может быть связан с флуорогенным фрагментом, который высвобождается при расщеплении протеазой. Определяя скорость расщепления при различных концентрациях фермента, можно определить k_{cat} для конкретной протеазы. Константу специфичности можно использовать для определения предпочтения протеазой одного целевого субстрата по сравнению с другим субстратом.

Используемый в настоящем документе термин «субстратная специфичность» или «специфичность по отношению к субстрату» относится к предпочтению протеазой одного целевого субстрата в сравнении с другим. Специфичность субстрата может быть измерена как отношение констант специфичности.

Как используется в настоящем документе, отношение специфичности субстрата представляет собой отношение констант специфичности и может использоваться для сравнения специфичности двух или более протеаз или протеазы для еще двух субстратов. Например, субстратную специфичность протеазы для конкурирующих субстратов или конкурирующих протеаз для субстрата можно сравнить, сравнивая k_{cat}/K_m . Например,

протеаза, которая имеет константу специфичности $2 \times 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ для целевого субстрата и $2 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ для нецелевого субстрата, более специфична для целевого субстрата. Используя константы специфичности, указанные выше, протеаза имеет коэффициент специфичности субстрата 100 для целевого субстрата.

Как используется в настоящем документе, предпочтение или специфичность субстрата для целевого субстрата может быть выражено как отношение специфичности субстрата. Конкретное значение отношения, которое отражает предпочтение, является функцией рассматриваемых субстратов и протеаз. Отношение специфичности субстрата, которое больше 1, означает предпочтение для целевой подложки, а специфичность субстрата меньше 1 означает предпочтение для нецелевого субстрата.

Как правило, отношение по меньшей мере или около 1 отражает достаточную разницу для протеазы, чтобы ее можно было рассматривать в качестве терапевтического кандидата.

Как используется в настоящем документе, измененная специфичность относится к изменению субстратной специфичности модифицированной протеазы по сравнению с исходной протеазой дикого типа. Как правило, изменение специфичности является отражением изменения предпочтения модифицированной протеазы целевого субстрата по сравнению с субстратом диазы типа протеазы (в настоящем документе упоминается как нецелевой субстрат). Как правило, модифицированные протеазы MTSP-1, раскрытые в данном документе, проявляют повышенную специфичность к субстрату для белка СЗ комплемента по сравнению со специфичностью к субстрату протеазы MTSP-1 дикого типа. Например, модифицированная протеаза, которая имеет коэффициент специфичности субстрата 100 для целевого субстрата по сравнению с нецелевым субстратом, демонстрирует 10 – кратную повышенную специфичность по сравнению с каркасной протеазой с коэффициентом специфичности субстрата 10. В другом примере модифицированная протеаза, которая имеет отношение специфичности субстрата 1 по сравнению с отношением 0,1, демонстрирует 10 – кратное увеличение специфичности субстрата. Чтобы продемонстрировать повышенную специфичность по сравнению с каркасной протеазой, модифицированная протеаза имеет 1,5 – кратную, 2 – кратную, 5 – кратную, 10 – кратную, 50 – кратную, 100 – кратную, 200 – кратную, 300 – кратную, 400 – кратную, 500 – кратную или еще бóльшую специфичность к субстрату для любого одного или более белков комплемента.

Используемый в настоящем документе термин «селективность» можно использовать взаимозаменяемо со специфичностью, когда речь идет о способности протеазы выбирать и расщеплять один целевой субстрат из смеси конкурирующих

субстратов. Повышенную селективность протеазы для целевого субстрата по сравнению с любым другим одним или несколькими целевыми субстратами можно определить, например, путем сравнения констант специфичности расщепления целевых субстратов протеазой. Например, если протеаза имеет константу специфичности расщепления $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{сек}^{-1}$ для целевого субстрата и $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{сек}^{-1}$ для любого другого одного или более субстратов, то протеаза является более селективной для целевого субстрата.

Используемый в настоящем документе термин «активность» или «функциональная активность» полипептида, такого как протеаза, относится к любой активности, проявляемой полипептидом. Такие действия могут быть определены эмпирически. Типичные активности включают, но не ограничиваются ими, способность взаимодействовать с биомолекулой, например, посредством связывания субстрата, связывания ДНК или димеризации, ферментативной активности, например, киназной активности или протеолитической активности. Для протеазы (включая фрагменты протеазы) активности включают, но не ограничиваются ими, способность специфически связывать конкретный субстрат, аффинность и/или специфичность связывания субстрата (например, высокое или низкое сродство и/или специфичность), эффекторные функции, такие как способность стимулировать ингибирование субстрата (например, белка, т. е. С3), нейтрализация, расщепление или клиренс, и действия *in vivo*, такие как способность стимулировать расщепление или клиренс белка. Активность может быть оценена *in vitro* или *in vivo* с использованием признанных анализов, таких как ELISA, проточная цитометрия, поверхностный плазмонный резонанс или эквивалентные анализы для измерения включенной или выключенной скорости, иммуногистохимии и иммунофлуоресцентной гистологии и микроскопии, клеточных анализов и анализов связывания. Например, для протеазы, например модифицированной протеазы MTSP-1, активности можно оценивать путем измерения расщепления субстрата, оборота, остаточной активности, стабильности и/или уровней *in vitro* и/или *in vivo*. Результаты таких анализов *in vitro*, которые указывают на то, что полипептид проявляет активность, могут коррелировать с активностью полипептида *in vivo*, в котором активность *in vivo* может упоминаться как терапевтическая активность или биологическая активность. Активность модифицированного полипептида может быть любым уровнем процентной доли активности немодифицированного полипептида, включая, но не ограничиваясь, примерно 1% от активности, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20 %, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%), 500%) или больше активности по сравнению с немодифицированным полипептидом. Анализы для

определения функциональности или активности модифицированных (или вариантных) протеаз хорошо известны в данной области.

Функциональная активность включает, но не ограничивается ими, биологическую активность, каталитическую или ферментативную активность, антигенность (способность связываться или конкурировать с полипептидом за связывание с анти-полипептидным антителом), иммуногенность, способность образовывать мультимеры и способность полипептида специфически связываться с рецептором или лигандом.

Используемый в настоящем документе термин «функциональная активность в отношении белка комплемента» относится к функции, опосредованной комплементом, включая, но не ограничиваясь этим, анафилаксию, опсонизацию, хемотаксис или лизис клеток. Неограничивающие анализы для тестирования активности комплемента включают гемолиз эритроцитов и обнаружение эффекторных молекул комплемента, таких как ELISA или SDS-PAGE.

Используемый в настоящем документе термин «каталитическая активность» или «активность расщепления» относится к активности протеазы, оцененной в протеолитических анализах *in vitro*, которые обнаруживают протеолиз выбранного субстрата. Активность расщепления может быть измерена путем оценки каталитической эффективности протеазы.

Как используется в настоящем документе, активность в отношении целевого субстрата относится к активности расщепления и/или функциональной активности или другому измерению, которое отражает активность протеазы на целевом субстрате или в отношении целевого субстрата. Функциональная активность целевого субстрата белка комплемента по протеазе может быть измерена путем оценки IC_{50} в анализе комплемента, таком как лизис эритроцитов, или других таких анализах, известных специалисту в данной области техники или представленных здесь для оценки активности комплемента. Активность расщепления может быть измерена путем оценки каталитической эффективности протеазы. Для целей настоящего изобретения активность повышается, если протеаза проявляет больший протеолиз или расщепление целевого субстрата и/или модулирует (то есть активирует или ингибирует) функциональную активность белка комплемента по сравнению с таковым в отсутствие протеазы.

Используемый в настоящем документе термин «повышенная активность» в отношении модифицированного полипептида MTSP-1 означает, что при тестировании в тех же условиях модифицированный полипептид MTSP-1 проявляет большую активность по сравнению с немодифицированным полипептидом MTSP-1, не содержащим аминокислотную замену или несколько замен. Например, модифицированный полипептид

MTSP-1 проявляет по меньшей мере или примерно по меньшей мере 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300 %, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% или более активности немодифицированного или эталонного полипептида MTSP-1.

Используемый здесь термин «то же самое», при использовании в отношении аффинности связывания антитела, означает, что значение EC_{50} , константы ассоциации (K_a) или константы диссоциации (K_d) находится в пределах от 1 до 100 раз или от 1 до 10 раз от такового значения эталонного антитела (в 1–100 раз большее сродство или в 1–100 раз меньшее сродство, или любое числовое значение или диапазон или значение в таких диапазонах, чем у эталонного антитела).

Используемый в настоящем документе термин «активность связывания» относится к характеристикам молекулы, например полипептида, относящимся к тому, связывается ли он или нет, и как он связывается с одним или более партнеров по связыванию. Активность связывания включает способность связываться с партнером (партнерами) по связыванию, аффинность, с которой он связывается с партнером по связыванию (например, высокую аффинность), силу связи с партнером по связыванию и/или специфичность связывания с партнером по связыванию.

Используемый в данном документе EC_{50} , также называемый кажущимся K_d , представляет собой концентрацию (например, в нМ) протеазы, где 50% максимальной активности наблюдается на фиксированном количестве субстрата (например, концентрация модифицированного полипептида MTSP-1, необходимая для расщепления 50% доступного hC3). Как правило, значения EC_{50} определяются из сигмоидальных кривых доза – ответ, где EC_{50} – концентрация в точке перегиба. Высокое сродство протеазы к его субстрату коррелирует с низким значением EC_{50} , а низкое сродство соответствует высокому значению EC_{50} . Константы аффинности могут быть определены с помощью стандартных кинетических методов для протеазных реакций, например, иммуноанализов, таких как ELISA, с последующим методом подгонки кривых.

Используемый в настоящем документе термин «константа аффинности» или «константа сродства» относится к константе ассоциации (K_a), используемой для измерения аффинности или силы молекулярного связывания между протеазой и субстратом. Чем выше константа афинности (сродства), тем больше сродство у протеазы к субстрату. Константы аффинности выражаются в единицах обратной молярности (то есть M^{-1}) и могут быть рассчитаны из константы скорости реакции ассоциации – диссоциации, измеренной при помощи стандартных кинетических методов для реакций протеаза – субстрат (например, посредством иммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса, или

других анализов кинетического взаимодействия, известных в данной области). Аффинность связывания протеазы также может быть выражена в виде константы диссоциации или K_d . Константа диссоциации является обратной величиной константы ассоциации, $K_d = 1/K_a$. Следовательно, константа аффинности (сродства) также может быть представлена через K_d . Константы аффинности могут быть определены с помощью стандартных кинетических методов для протеазных реакций, например, посредством иммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса (SPR) [1 – 2], калориметрии с изотермическим титрованием (ИТС) или других анализов кинетического взаимодействия, известных в данной области [3]. Инструментарий и методы для обнаружения и мониторинга скорости связывания в реальном времени известны и имеются в продаже (например, BIAcore 2000, BIAcore AB, Uppsala, Sweden and GE Healthcare Life Sciences; [4]).

Методы расчета аффинности (сродства), такие как методы определения значений EC_{50} или методы определения констант ассоциации /диссоциации, хорошо известны. Например, с точки зрения EC_{50} , высокая аффинность связывания означает, что протеаза специфически связывается с целевым белком со значением EC_{50} , которое составляет менее чем приблизительно 10 нг/мл, 9 нг/мл, 8 нг/мл, 7 нг/мл, 6 нг/мл, 5 нг/мл, 4 нг/мл, 3 нг/мл, 2 нг/мл, 1 нг/мл или менее. Высокая аффинность связывания также может характеризоваться значениями равновесной константы диссоциации (K_d) 10^{-6} М или ниже, такими как 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М или 10^{-12} М или ниже. С точки зрения равновесной константы ассоциации (K_a), высокая аффинность связывания обычно связана со значениями K_a , большими или равными примерно 10^6 М⁻¹, такими как большие или равные примерно 10^7 М⁻¹, большие или равные примерно 10^8 М⁻¹ или большие или равные примерно 10^9 М⁻¹, 10^{10} М⁻¹, 10^{11} М⁻¹ или 10^{12} М⁻¹. Сродство может быть оценено эмпирически или сродство может быть определено сравнительно, например, путем сравнения аффинности двух или более антител к конкретному антигену, например, путем вычисления парных отношений аффинности тестируемых антител. Например, такие значения аффинности могут быть легко определены с использованием традиционных методов, таких как ELISA, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс, радиоиммуноанализ с использованием меченого радиоактивным изотопом антигена-мишени, или любой другой способ, известный специалисту в данной области. Данные об аффинности (сродстве) можно анализировать, например, методом [5] или методом подгонки кривых, например, с использованием нелинейной регрессионной модели с 4 параметрами и с использованием уравнения: $y = ((A-D)/(1+((x/C)^B))) + D$, где A – минимальная асимптота, B – коэффициент наклона, C – точка перегиба (EC_{50}), а D – максимальная асимптота.

Используемый в настоящем документе термин «ED₅₀» представляет собой дозу (например, в мг/кг или в нМ) протеазы (например, модифицированной протеазы MTSP-1), которая дает определенный результат (например, расщепление белка C3 комплемента) у 50% от общего количества используемых в эксперименте единиц (например, общего количества белка C3, присутствующего в выборке).

Используемый в настоящем документе термин «практически то же самое» при использовании в отношении EC₅₀, константы ассоциации (K_a) или константы диссоциации (K_d) или эффективной дозы ED₅₀ означает, что значения K_a, K_d, EC₅₀ или ED₅₀ находятся в пределах примерно от 5 до 5000 раз больше или меньше, чем соответствующие значения K_a, K_d, EC₅₀ или ED₅₀ эталонного MTSP-1 (в 5–5000 раз больше или в 5–5000 раз меньше, чем эталонный MTSP-1, т.е. MTSP-1 дикого типа).

Используемый в настоящем документе термин «поверхностный плазмонный резонанс» относится к оптическому явлению, которое позволяет анализировать взаимодействия в реальном времени путем обнаружения изменений концентраций белка в матрице биосенсора, например, с использованием системы BIAcore (GE Healthcare Life Sciences).

Используемый в настоящем документе белок человека представляет собой белок, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, такой как ДНК, присутствующей в геноме человека, включая все аллельные варианты и их консервативные варианты. Вариант или модификация белка представляет собой вариант или модификацию человеческого белка, если модификация основана на диком типе или известной последовательности человеческого белка.

Как используется в настоящем документе, остатки встречающихся в природе α – аминокислот представляют собой остатки тех 20 α – аминокислот, которые встречаются в природе и которые включены в белок путем специфического распознавания «заряженной» молекулы тРНК ее родственным кодоном мРНК у людей.

В контексте настоящего документа, не встречающиеся в природе аминокислоты относятся к аминокислотам, которые не кодируются генетически.

Используемый в настоящем документе термин «нуклеиновая кислота» относится по меньшей мере к двум связанным нуклеотидам или производным нуклеотидов, включая дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и рибонуклеиновую кислоту (РНК) и их аналоги, соединенные вместе, обычно с помощью фосфодиэфирных связей. В термин «нуклеиновая кислота» также включены аналоги нуклеиновых кислот, такие как пептидная нуклеиновая кислота (ПНК), фосфоротиоатная ДНК и другие подобные аналоги и производные, или их комбинации. Нуклеиновые кислоты также включают производные ДНК и РНК,

содержащие, например, нуклеотидный аналог или «основную» связь, отличную от фосфодиэфирной связи, например, фосфотриэфирную связь, фосфорамидатную связь, фосфоротиоатную связь, тиоэфирную связь или пептид связь (пептидная нуклеиновая кислота). Термин также включает в качестве эквивалентов производные, варианты и аналоги либо РНК, либо ДНК, изготовленной из аналогов нуклеотидов, одноцепочечных (смысловых или антисмысловых) и двухцепочечных нуклеиновых кислот. Дезоксирибонуклеотиды включают дезоксиаденозин, дезоксицитидин, дезоксигуанозин и дезокситимидин. Для РНК урациловой основой является уридин. Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. При ссылке на зонды или праймеры, которые необязательно помечены, например, детектируемой меткой, такой как флуоресцентная или радиоактивная метка, рассматриваются одноцепочечные молекулы. Такие молекулы обычно имеют длину, такую, что их цель является статистически уникальной, или имеют низкое количество копий (обычно менее 5, как правило менее 3) для исследования или заполнения библиотеки. Обычно зонд или праймер содержит по меньшей мере 14, 16 или 30 смежных нуклеотидов, последовательность которых комплементарна или идентична интересующему гену. Зонды и праймеры могут иметь длину 10, 20, 30, 50, 100 или более нуклеотидов.

Как использовано в настоящем документе, изолированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу, которая отделена от других молекул нуклеиновой кислоты, которые присутствуют в природном источнике молекулы нуклеиновой кислоты. «Изолированная» молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула кДНК, может быть по существу свободной от другого клеточного материала или культуральной среды, если она произведена рекомбинантными методами, или, по существу, не содержать химических предшественников или других химических веществ, когда является химически синтезированной. Типичные изолированные молекулы нуклеиновой кислоты, раскрытые в данном документе, включают изолированные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие представленную протеазу MTSP-1.

Используемый в настоящем документе термин «синтетический» по отношению к, например, молекуле синтетической нуклеиновой кислоты, синтетическому гену или синтетическому пептиду, относится к молекуле нуклеиновой кислоты или полипептидной молекуле, которая продуцируется рекомбинантными способами и/или методами химического синтеза.

Используемый в настоящем документе термин «полипептид» относится к двум или более ковалентно связанным аминокислотам. Термины «полипептид» и «белок» используются здесь взаимозаменяемо.

Используемый в настоящем документе термин «пептид» относится к полипептиду длиной от 2 до около 40 аминокислот.

Как используется в настоящем документе, аминокислоты, которые встречаются в различных последовательностях аминокислот, представленных в настоящем документе, идентифицируются в соответствии с их известными трехбуквенными или однобуквенными сокращениями (Таблица 2). Нуклеотиды, которые встречаются в различных фрагментах нуклеиновых кислот, обозначены стандартными однобуквенными обозначениями, обычно используемыми в данной области.

Используемый в настоящем документе термин «аминокислота» представляет собой органическое соединение, содержащее аминогруппу и группу карбоновой кислоты. Полипептид содержит две или более аминокислот. Для целей настоящего изобретения аминокислоты включают в себя двадцать природных аминокислот (Таблица 2), неприродные аминокислоты и аналоги аминокислот (то есть аминокислоты, в которых α – углерод имеет боковую цепь).

Как используется в настоящем документе, аминокислоты, которые встречаются в различных аминокислотных последовательностях полипептидов в данном документе, идентифицируются в соответствии с их хорошо известными трехбуквенными или однобуквенными сокращениями (см. Таблицу 2). Нуклеотиды, которые встречаются в различных молекулах и фрагментах нуклеиновых кислот, обозначены стандартными однобуквенными обозначениями, обычно используемыми в данной области.

Используемый в настоящем документе термин «аминокислотный остаток» относится к аминокислоте, образованной при химическом расщеплении (гидролизе) полипептида по его пептидным связям. Предполагается, что описанные здесь аминокислотные остатки находятся в "L" –изомерной форме. Остатки в изомерной "D" форме, которые обозначены таким образом, могут быть заменены любым остатком L – аминокислоты, пока желаемое функциональное свойство сохраняется полипептидом. NH_2 относится к свободной аминогруппе, присутствующей на амино конце (N–конце) полипептида. COOH относится к свободной карбоксильной группе, присутствующей на карбоксильном конце (C–конце) полипептида. В соответствии со стандартной полипептидной номенклатурой, описанной в [6] и принятой в 37 C.F.R. §§ 1.821–1.822, обозначения аминокислотных остатков приведены в таблице 2.

Таблица 2. Таблица соответствия аминокислотных остатков и их обозначений.

Обозначение		Аминокислота
1 – буквенное	3 – буквенное	
Y	Tyr	тирозин
G	Gly	глицин
F	Phe	фенилаланин
M	Met	метионин
A	Ala	аланин
S	Ser	серин
I	Ile	изолейцин
L	Leu	лейцин
T	Thr	треонин
V	Val	валин
P	Pro	пролин
K	Lys	лизин
H	His	гистидин
Q	Gln	глутамин
E	Glu	глутаминовая кислота
Z	Glx	Glu и/или Gln
W	Trp	триптофан
R	Arg	аргинин
D	Asp	аспарагиновая кислота
N	Asn	аспарагин
B	Asx	Asn и/или Asp
C	Cys	цистеин
X	Xaa	неизвестная или иная

Все аминокислотные последовательности, раскрытые в формуле данного изобретения, имеют ориентацию слева направо в общепринятом направлении от аминоконца к карбоксильному концу. Кроме того, фраза «аминокислотный остаток» определяется как включающая аминокислоты, перечисленные в Таблице соответствия (Таблица 2), модифицированные, неприродные и необычные аминокислоты. Кроме того, тире в начале или конце последовательности аминокислотных остатков указывает пептидную связь с дополнительной последовательностью одного или нескольких

аминокислотных остатков или с аминоконцевой группой, такой как NH_2 , или с карбоксильной концевой группой, такой как COOH ,

Используемый в настоящем документе термин «встречающиеся в природе аминокислоты» относится к 20 L – аминокислотам, которые встречаются в полипептидах. Как используется в настоящем документе, остатки встречающихся в природе α – аминокислот представляют собой остатки тех 20 α – аминокислот, которые встречаются в природе и которые включены в белок путем специфического распознавания заряженной молекулы тРНК с помощью ее родственного кодона мРНК у людей.

Используемый в настоящем документе термин «неприродная аминокислота» относится к органическому соединению, которое имеет структуру, подобную природной аминокислоте, но было структурно модифицировано для имитации структуры и реакционной способности природной аминокислоты. Таким образом, не встречающиеся в природе аминокислоты включают, например, аминокислоты или аналоги аминокислот, отличных от 20 встречающихся в природе аминокислот, и включают, но не ограничиваются ими, D – стереоизомеры аминокислот. Типичные неприродные аминокислоты известны специалистам в данной области и включают, но не ограничиваются ими, пара-ацетилфенилаланин, пара-азидо-фенилаланин, 2-аминоадипиновую кислоту (Aad), 3-аминоадипиновую кислоту (bAad), β -аланин/ β -амино-пропионовую кислоту (Bala), 2-аминомасляную кислоту (Abu), 4-амино-масляную кислоту/пиперидиновую кислоту (4Abu), 6-аминокапроновую кислоту (Acp), 2-аминогептановую кислоту (Ahe), 2-аминоизомасляную кислоту (Aib), 3-аминоизомасляную кислоту (Baib), 2-аминопимелиновую кислоту (Apm), 2,4-диаминомасляную кислоту (Dbu), десмосин (Des), 2,2'-диаминопимелиновую кислоту (Dpm), 2,3-диаминопропионовую кислоту (Dpr), N-этилглицин (EtGly), N-этиласпарагин (EtAsn), гидроксизин (Hyl), алло-гидроксизин (Ahyl), 3-гидроксипролин (3Hyp), 4-гидроксипролин (4Hyp), Изодезозин (Ide), алло-изолейцин (Aile), N-метилглицин, саркозин (MeGly), N-метилизолейцин (Melle), 6-N-метиллизин (MeLys), N-метилвалин (MeVal), норвалин (Nva), Норлейцин (Nle) и Орнитин (Orn). Типичные неприродные аминокислоты описаны в данном документе и известны специалистам в данной области техники.

Используемый в настоящем термин «изокинетическая смесь» представляет собой смесь, в которой молярные соотношения аминокислот были отрегулированы на основе их сообщенных скоростей реакции (см., например, [7]).

Как используется в настоящем документе, конструкция ДНК представляет собой одно – или двухцепочечную, линейную или кольцевую молекулу ДНК, которая содержит сегменты ДНК, объединенные и расположенные рядом способом, не встречающимся в

природе. ДНК – конструкции существуют в результате человеческих манипуляций и включают клоны и другие копии управляемых молекул.

Как используется в настоящем документе, сегмент ДНК представляет собой часть более крупной молекулы ДНК, имеющей определенные атрибуты. Например, сегмент ДНК, кодирующий указанный полипептид, представляет собой часть более длинной молекулы ДНК, такой как плазида или плазмидный фрагмент, который при считывании в направлении от 5' до 3' кодирует последовательность аминокислот указанного полипептида.

Термин «ортолог» означает полипептид или белок, полученный из одного вида, который является функциональным аналогом полипептида или белка из другого вида. Различия в последовательности между ортологами являются результатом видообразования.

Термин «полинуклеотид» означает одно – или двухцепочечный полимер дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидных оснований, считываемых с 5' до 3' конца. Полинуклеотиды включают РНК и ДНК и могут быть выделены из природных источников, синтезированы *in vitro* или получены из комбинации природных и синтетических молекул. Длина полинуклеотидной молекулы дана здесь в пересчете на нуклеотиды (сокращенно «nt») или пары оснований (сокращенно «bp»). Термин нуклеотиды используется для одно- и двухцепочечных молекул, если позволяет контекст. Когда термин применяется к двухцепочечным молекулам, он используется для обозначения общей длины и будет пониматься как эквивалентный термину пары оснований. Специалистам в данной области будет понятно, что две нити двухцепочечного полинуклеотида могут незначительно отличаться по длине и что их концы могут быть в шахматном порядке; таким образом, все нуклеотиды в двухцепочечной полинуклеотидной молекуле не могут быть спаренными. Такие непарные концы, как правило, не превышают 20 нуклеотидов в длину.

Как используется в настоящем документе, выравнивание последовательности относится к использованию гомологии для выравнивания двух или более последовательностей нуклеотидов или аминокислот. Как правило, две или более последовательности, которые связаны на 50% или более идентичности, выровнены. Выровненный набор последовательностей относится к 2 или более последовательностям, которые выровнены в соответствующих положениях и могут включать в себя выравнивающие последовательности, полученные из РНК, таких как EST и другие кДНК, выровненные по последовательности геномной ДНК. Родственные или варианты полипептиды или молекулы нуклеиновой кислоты могут быть выровнены любым способом, известным специалистам в данной области. Такие способы обычно максимизируют совпадения и включают в себя способы, такие как использование ручного выравнивания и использование многочисленных доступных программ выравнивания

(например, BLASTP) и другие, известные специалистам в данной области техники. Совмещая последовательности полипептидов или нуклеиновых кислот, специалист в данной области может идентифицировать аналогичные части или положения, используя консервативные и идентичные аминокислотные остатки в качестве направляющих. Кроме того, специалист в данной области также может использовать консервативные аминокислотные или нуклеотидные остатки в качестве указателей для поиска соответствующих аминокислотных или нуклеотидных остатков среди последовательностей человека и нечеловека, а также между ними. Соответствующие положения также могут быть основаны на структурных выравниваниях, например, с использованием компьютерных симуляций выравнивания структуры белка. В других случаях соответствующие регионы могут быть идентифицированы. Специалист в данной области также может использовать консервативные аминокислотные остатки в качестве указателей для поиска соответствующих аминокислотных остатков среди последовательностей человека и нечеловека и между ними.

Используемый в настоящем документе термин «идентичность последовательности» относится к числу идентичных или сходных аминокислот или нуклеотидных оснований в сравнении между тестом и эталонным полипептидом или полинуклеотидом. Идентичность последовательности может быть определена путем выравнивания последовательностей нуклеиновой кислоты или белка для идентификации областей сходства или идентичности. Для целей настоящего описания идентичность последовательности обычно определяют выравниванием для идентификации идентичных остатков. Выравнивание может быть локальным или глобальным. Совпадения, несовпадения и пропуски могут быть идентифицированы между сравниваемыми последовательностями. Разрывы представляют собой нулевые аминокислоты или нуклеотиды, вставленные между остатками выровненных последовательностей, так что идентичные или сходные символы выровнены. Как правило, могут быть внутренние и концевые разрывы. Идентичность последовательности может быть определена путем учета промежутков как: (число идентичных остатков/длину самой короткой последовательности) $\times$ 100. При использовании штрафов за промежутки может быть определена идентичность последовательности без штрафа за концевые промежутки (например, концевые промежутки не штрафуются). Альтернативно, идентичность последовательности может быть определена без учета промежутков как: (число идентичных положений/длину всей выровненной последовательности) $\times$ 100.

Используемый в настоящем документе термин «в соответствующем положении» или в котором указано, что положения нуклеотидов или аминокислот «соответствуют»

положениям нуклеотидов или аминокислот в раскрытой последовательности, такой как изложенная в перечне последовательностей, относится к идентифицированным положениям нуклеотидов или аминокислот. При выравнивании с раскрытой последовательностью для максимизации идентичности используют стандартный алгоритм выравнивания, такой как алгоритм GAP. Для целей настоящего описания выравнивание последовательности MTSP-1 соответствует аминокислотной последовательности домена протеазы человеческого MTSP-1, представленной в SEQ ID NO: 2, или, в частности, эталонному MTSP-1 SEQ ID NO: 4. Совмещая последовательности, специалист в данной области может идентифицировать соответствующие остатки, например, используя консервативные и идентичные аминокислотные остатки в качестве направляющих. В общем, чтобы идентифицировать соответствующие позиции, последовательности аминокислот выравнивают так, чтобы получить соответствие наивысшего порядка (см., например: [8–13]). Альтернативно, специалист в данной области может пронумеровать остатки по количеству химотрипсина, тем самым идентифицируя соответствующие остатки. Для тесно связанных последовательностей компьютерный алгоритм не нужен; выравнивание можно сделать визуально.

Как используется в настоящем документе, «глобальное выравнивание» представляет собой выравнивание, которое выравнивает две последовательности от начала до конца, выравнивая каждую букву в каждой последовательности только один раз. Выравнивание производится независимо от того, существует ли сходство или идентичность между последовательностями. Например, 50% идентичности последовательности на основе «глобального выравнивания» означает, что при выравнивании полной последовательности двух сравниваемых последовательностей, каждая из которых имеет длину 100 нуклеотидов, 50% остатков являются одинаковыми. Понятно, что глобальное выравнивание также можно использовать при определении идентичности последовательности, даже когда длина выровненных последовательностей не одинакова. Различия в концевых концах последовательностей будут приниматься во внимание при определении идентичности последовательности, если не выбрано «без штрафа за концевые промежутки». Как правило, глобальное выравнивание используется для последовательностей, которые имеют значительное сходство по большей части их длины. Примерные алгоритмы для выполнения глобального выравнивания включают в себя алгоритм Нидлмана – Вунша [14]. Примерные программы для выполнения глобального выравнивания являются общедоступными и включают в себя инструмент глобального выравнивания последовательностей, доступный на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI)

(ncbi.nlm.nih.gov/), и программу, доступную по адресу deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html.

Как используется в настоящем документе, «локальное выравнивание» представляет собой выравнивание, которое выравнивает две последовательности, но выравнивает только те части последовательностей, которые имеют сходство или идентичность. Следовательно, локальное выравнивание определяет, присутствуют ли подсегменты одной последовательности в другой последовательности. Если нет сходства, выравнивание не будет возвращено. Алгоритмы локального выравнивания включают алгоритм BLAST или алгоритм Смита – Ватермана (Smith – Waterman algorithm) [15]. Например, 50% идентичности последовательностей на основе «локального выравнивания» означает, что при выравнивании полной последовательности двух сравниваемых последовательностей любой длины область сходства или идентичности длиной 100 нуклеотидов имеет 50% остатков, которые являются то же самое в области сходства или идентичности.

Идентичность последовательности может быть определена стандартными программами алгоритма выравнивания, используемыми со штрафами за пробелы по умолчанию, установленными каждым поставщиком. Параметры по умолчанию для программы GAP могут включать: (1) унарную матрицу сравнения (содержащую значение 1 для тождеств и 0 для не тождеств) и взвешенную матрицу сравнения [16], как описано в [17]; (2) штраф 3,0 за каждый пробел и дополнительный штраф 0,10 за каждый символ в каждом пробеле; и (3) нет штрафа за конечные промежутки. Независимо от того, имеют ли какие-либо две молекулы нуклеиновой кислоты нуклеотидные последовательности, или любые два полипептида имеют аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% являются «идентичными», или другие аналогичные вариации, в которых указывается процент идентичности, могут быть определены с использованием известных компьютерных алгоритмов, основанных на локальном или глобальном выравнивании (см., например, wikipedia.org/wiki/Sequence_alignment_software, предоставляя ссылки на десятки известных и общедоступных баз данных и программ выравнивания). Как правило, для целей настоящего описания идентичность последовательности определяется с использованием компьютерных алгоритмов, основанных на глобальном выравнивании, таких как инструмент глобального выравнивания последовательности Needleman–Wunsch, доступный в NCBI/BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&Page_TYPE=BlastHome); LAlign (Уильям Пирсон, реализующий алгоритм Хуанга и Миллера [18]; и программу от Xiaoqui Huang, доступную по адресу deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html. Как правило, при сравнении нуклеотидных последовательностей здесь используется

выравнивание с штрафом за концевые промежутки. Локальное выравнивание также можно использовать, когда сравниваемые последовательности по существу имеют одинаковую длину.

Следовательно, используемый в настоящем документе термин «идентичность» представляет собой сравнение или сопоставление между тестом и эталонным полипептидом или полинуклеотидом. В одном неограничивающем примере термин «по меньшей мере, 90% идентичен» относится к процентам идентичности от 90% до 100%) относительно эталонного полипептида или полинуклеотида. Идентичность на уровне 90% или более указывает на тот факт, что при условии, что для целей примера сравнивают тестовый и эталонный полипептид или полинуклеотид длиной 100 аминокислот или нуклеотидов, не более 10% (т.е. 10 из 100) аминокислот или нуклеотидов в тестируемом полипептиде или полинуклеотиде отличается от такового у эталонных полипептидов. Подобные сравнения могут быть сделаны между тестовыми и контрольными полинуклеотидами. Такие различия могут быть представлены в виде точечных мутаций, случайно распределенных по всей длине аминокислотной последовательности, или они могут быть сгруппированы в одном или нескольких местах различной длины вплоть до максимально допустимой, например, разность аминокислот 10/100 (приблизительно 90% идентичность). Различия также могут быть связаны с делециями или усечениями аминокислотных остатков. Различия определяются как замены, вставки или делеции нуклеиновых кислот или аминокислот. В зависимости от длины сравниваемых последовательностей, на уровне гомологий или идентичностей выше примерно 85 – 90%, результат может быть независимым от программы и установленных параметров разрыва; такой высокий уровень идентичности может быть легко оценен, часто без использования программного обеспечения.

Как используется в настоящем документе, дисульфидная связь (также называемая S – S –связью или дисульфидным мостиком) представляет собой простую ковалентную связь, полученную в результате сочетания тиоловых групп. Дисульфидные связи в белках образуются между тиольными группами остатков цистеина и стабилизируют взаимодействия между полипептидными доменами.

Используемый здесь термин «связанный» или «конъюгированный» означает присоединенный посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия.

Используемый в настоящем документе термин «праймер» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая может выступать в качестве точки инициирования матрично-направленного синтеза ДНК при соответствующих условиях (например, в присутствии четырех различных нуклеозидтрифосфатов и агента полимеризации, такого

как ДНК–полимераза. РНК–полимераза или обратная транскриптаза) в подходящем буфере и при подходящей температуре. Понятно, что определенные молекулы нуклеиновой кислоты могут служить в качестве «зонда» и «праймера». Однако праймер имеет 3'-гидроксильную группу для удлинения. Праймер может быть использован различными способами, включая, например, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), обратную транскриптазу (RT)–PCR, РНК–ПЦР, LCR, мультиплексную ПЦР, ПЦР–захват, захватную ПЦР, экспрессионную ПЦР, 3' и 5' RACE, ПЦР *in situ*, лигированная ПЦР и другие протоколы амплификации.

Используемый в настоящем документе термин «праймер» относится к олигонуклеотиду, содержащему два или более дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов, обычно более трех, из которых можно инициировать синтез продукта удлинения праймера. Условия эксперимента, способствующие синтезу, включают присутствие нуклеозидтрифосфатов и агента для полимеризации и удлинения, такого как ДНК – полимераза, и подходящего буфера, температуры и рН.

Используемый в настоящем документе термин «пара праймеров» относится к набору праймеров, который включает 5' (восходящий) праймер, который гибридизуется с 5' концом последовательности, подлежащей амплификации (например, с помощью ПЦР), и 3' (нисходящий) праймер, который гибридизуется с комплементом 3' конца последовательности, подлежащей амплификации.

Используемый в настоящем документе термин «специфически гибридизуется» относится к отжигу путем комплементарного спаривания оснований молекулы нуклеиновой кислоты (например, олигонуклеотида) с целевой молекулой нуклеиновой кислоты. Специалистам в данной области известны параметры *in vitro* и *in vivo*, которые влияют на специфическую гибридизацию, такую как длина и состав конкретной молекулы. Параметры, особенно относящиеся к гибридизации *in vitro*, дополнительно включают температуру отжига и промывки, буферную композицию и концентрацию соли. Примерные условия промывки для удаления неспецифически связанных молекул нуклеиновой кислоты при высокой строгости составляют $0,1 \times \text{SSPE}$, 0,1% SDS, 65°C, а при средней строгости – $0,2 \times \text{SSPE}$, 0,1% SDS, 50°C. Эквивалентные условия жесткости известны в данной области. Специалист в данной области может легко отрегулировать эти параметры для достижения специфической гибридизации молекулы нуклеиновой кислоты с целевой молекулой нуклеиновой кислоты, подходящей для конкретного применения.

Используемый здесь термин «по существу идентичный продукту» означает достаточно похожий, так что интересующее свойство является достаточно неизменным, так что по существу продукт может использоваться вместо идентичного продукта.

При использовании в настоящем документе также подразумевается, что термины «по существу идентичные» или «похожие» варьируются в зависимости от контекста, понятного специалистам в соответствующей области техники.

В настоящем документе форма дикого типа молекулы полипептида или нуклеиновой кислоты представляет собой форму, кодируемую геном или кодирующей последовательностью, кодируемой геном. Как правило, форма дикого типа гена или молекулы, кодируемой таким образом, не содержит мутаций или других модификаций, которые изменяют функцию или структуру. Термин «дикий тип» также охватывает формы с аллельными вариациями, которые встречаются между видами.

Используемый в настоящем документе термин «преобладающая форма молекулы полипептида или нуклеиновой кислоты» относится к форме молекулы, которая является основной формой, продуцируемой из гена. «Преобладающая форма» варьируется от источника к источнику. Например, разные клетки или типы тканей могут продуцировать разные формы полипептидов, например, путем альтернативного сплайсинга и/или альтернативной обработки белка. В каждом типе клеток или тканей разные «полипептиды» могут быть «преобладающей формой».

Используемый в настоящем документе аллельный вариант или аллельный вариант относится к любой из двух или более альтернативных форм гена, занимающих один и тот же хромосомный локус. Аллельные вариации возникают естественным путем в результате мутаций и могут приводить к фенотипическому полиморфизму в популяциях. Генные мутации могут быть молчащими (без изменений в кодируемом полипептиде) или могут кодировать полипептиды, имеющие измененную аминокислотную последовательность. Термин «аллельный вариант» также используется в данном документе для обозначения белка, кодируемого аллельным вариантом гена. Обычно эталонная форма гена кодирует форму дикого типа и/или преобладающую форму полипептида из популяции или одного эталонного члена вида. Как правило, аллельные варианты, которые включают варианты между и среди видов, имеют по меньшей мере 80%, 90% или более идентичность аминокислот с диким типом и/или преобладающей формой из одного и того же вида; степень идентичности зависит от гена и от того, является ли сравнение межвидовым или внутривидовым. Как правило, внутривидовые аллельные варианты имеют, по меньшей мере, или, по меньшей мере, около 80%, 85%, 90% или 95% идентичности или более с диким типом и/или преобладающей формой, включая, по меньшей мере, или, по меньшей мере, около 96%, 97%, 98 %, 99% или более идентичности с диким типом и/или преобладающей формой полипептида.

Термин «аллель», который используется здесь взаимозаменяемо с термином «аллельный вариант», относится к альтернативным формам гена или его частям. Аллели занимают один и тот же локус или положение на гомологичных хромосомах. Когда у субъекта есть два идентичных аллеля гена, говорят, что субъект гомозиготен по этому гену или аллелю. Когда у субъекта есть два разных аллеля гена, он считается гетерозиготным по гену. Аллели определенного гена могут отличаться друг от друга одним нуклеотидом или несколькими нуклеотидами и могут включать замены, делеции и вставки нуклеотидов. Аллель гена также может быть формой гена, содержащей мутацию.

Используемые в настоящем документе варианты видов относятся к вариантам полипептидов среди разных видов, включая разные виды млекопитающих, таких как мышь и человек. Как правило, разновидности видов имеют около или по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичность последовательности. Соответствующие остатки между и среди вариантов видов могут быть определены путем сравнения и выравнивания последовательностей, чтобы максимизировать количество совпадающих нуклеотидов или остатков, например, так, чтобы идентичность между последовательностями была равна или больше 95%, равна или больше 96%, равно или больше 97%, равно или больше 98% или больше 99%. Затем интересующему положению присваивается номер, назначенный в эталонной молекуле нуклеиновой кислоты. Выравнивание может быть выполнено вручную или на глаз, в частности, когда идентичность последовательности превышает 80%.

Используемый в настоящем документе вариант сплайсинга относится к варианту, полученному путем дифференциальной обработки первичного транскрипта геномной ДНК, который приводит к более чем одному типу мРНК.

Используемый в настоящем документе термин «модификация» относится к модификации аминокислотной последовательности полипептида или последовательности нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты и включает делеции, вставки и замены аминокислот и нуклеотидов соответственно.

Для целей данного изобретения аминокислотные замены, делеции и/или вставки могут быть сделаны в любом полипептиде MTSP-1 или его каталитически активном фрагменте при условии, что полученный белок проявляет протеазную активность или другую активность (или, если желательно, такие изменения могут быть сделано для устранения активности). Модификации могут быть сделаны путем внесения консервативных аминокислотных замен, а также неконсервативных аминокислотных замен. Например, могут быть сделаны аминокислотные замены, которые желательно или преимущественно изменяют свойства белков. В одном варианте осуществления могут быть

сделаны мутации, которые предотвращают деградацию полипептида. Многие протеазы расщепляются после основных остатков, таких как R и K; для устранения такого расщепления основной остаток заменяется неосновным остатком. Взаимодействие протеазы с ингибитором может быть заблокировано при сохранении каталитической активности путем осуществления неконсервативного изменения в месте взаимодействия ингибитора с протеазой. Другие виды деятельности также могут быть изменены. Например, связывание рецептора может быть изменено без изменения каталитической активности.

Предполагаемые аминокислотные замены включают консервативные замены, такие как те, которые приведены в Таблице 3, которые не устраняют протеолитическую активность. Также рассматриваются замены, которые изменяют свойства белков, такие как удаление сайтов расщепления и других таких сайтов; такие замены обычно неконсервативны, но могут быть легко выполнены специалистами в данной области.

Используемые в настоящем документе подходящие консервативные замены аминокислот известны специалистам в данной области и могут быть сделаны, как правило, без изменения биологической активности получаемой молекулы. Специалисты в данной области признают, что, как правило, единичные аминокислотные замены в несущественных областях полипептида существенно не изменяют биологическую активность [19]. Такие замены могут быть сделаны в соответствии с изложенными в таблице 3 следующим образом:

Таблица 3. Подходящие консервативные замены аминокислот.

Исходный аминокислотный остаток	Типовые консервативные замены
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Другие замены также допустимы и могут быть определены опытным путем или в соответствии с известными консервативными заменами.

Используемый в настоящем документе термин промотор означает часть гена, содержащую последовательности ДНК, которые обеспечивают связывание РНК – полимеразы и инициацию транскрипции. Промоторные последовательности обычно, но не всегда, обнаруживаются в 5'-некодирующей области генов.

Как используется в настоящем документе, изолированный или очищенный полипептид или белок или его биологически активная часть по существу не содержат клеточного материала или других загрязняющих белков из клетки ткани, из которой получен белок, или по существу не содержат химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе.

Можно определить, что препараты являются по существу свободными, если они кажутся свободными от легко обнаруживаемых примесей, что определяется стандартными методами анализа, такими как тонкослойная хроматография (ТСХ), гель-электрофорез и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), используемая специалистами в искусство оценивать такую чистоту или достаточно чистую, чтобы дальнейшая очистка не могла заметно изменить физические и химические свойства вещества, такие как ферментативная и биологическая активность. Способы очистки соединений для получения по существу химически чистых соединений известны специалистам в данной области. Однако по существу химически чистое соединение может представлять собой смесь стереоизомеров. В таких случаях дальнейшая очистка может повысить удельную активность соединения.

Термин, по существу свободный от клеточного материала, включает препараты белков, в которых белок отделен от клеточных компонентов клеток, из которых он выделен или продуцирован рекомбинантным путем. В одном варианте осуществления термин, по существу, свободный от клеточного материала, включает препараты протеазных белков, содержащие менее чем около 30% (по сухому весу) непротеазных белков (также называемых в настоящем документе «загрязняющий белок»), обычно менее чем около 20% непротеазные белки или 10% непротеазных белков или менее примерно 5% непротеазных белков. Когда протеазный белок или его активная часть продуцируется рекомбинантным способом, он также практически не содержит культуральной среды, т.е. культуральная среда составляет менее, примерно или равна 20%, 10% или 5% от объема препарата протеазного белка.

Используемый в настоящем документе термин, по существу, не содержащий химических предшественников или других химических веществ, включает препараты

протеазных белков, в которых белок отделен от химических предшественников или других химических веществ, которые участвуют в синтезе белка. Термин включает препараты протеазных белков, имеющих менее чем около 30% (в пересчете на сухую массу), 20%, 10%, 5% или менее химических предшественников или непротеазных химических веществ или компонентов.

Как используется в настоящем документе, «получение рекомбинантного» или «продуцирование рекомбинантным» означает используя методы рекомбинантной ДНК относящиеся к применению хорошо известных методов молекулярной биологии для экспрессии белков, кодируемых клонированной ДНК.

Используемый в настоящем документе термин «экспрессия» относится к процессу, с помощью которого полипептиды получают путем транскрипции или трансляции полинуклеотидов. Уровень экспрессии полипептида может быть оценен с использованием любого метода, известного в данной области техники, включая, например, методы определения количества полипептида, продуцируемого клеткой–хозяином. Такие способы могут включать, но не ограничиваются этим, количественное определение полипептида в клеточном лизате с помощью ELISA, окрашивания кумасси синим после гель–электрофореза, анализа белка Лоури и анализа белка Брэдфорда.

Используемый в настоящем документе термин «клетка–хозяин» представляет собой клетку, которая используется для получения, поддержания, размножения и/или амплификации вектора. Клетки–хозяева также можно использовать для экспрессии полипептида, кодируемого вектором. Нуклеиновая кислота, содержащаяся в векторе, реплицируется при делении клетки–хозяина, тем самым амплифицируя нуклеиновые кислоты.

Используемый в настоящем документе термин «вектор» или «плазида» представляет собой реплицируемую нуклеиновую кислоту, из которой один или несколько гетерологичных белков могут быть экспрессированы, когда вектор трансформируется в подходящую клетку–хозяина. Ссылка на вектор включает в себя отдельные элементы, которые используются для введения гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетки для их экспрессии или репликации. Ссылка на вектор также включает те векторы, в которые может быть введена нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид или его фрагмент, обычно путем рестрикционного расщепления и лигирования. Ссылка на вектор также включает те векторы, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую протеазу, такую как модифицированный MTSP–1. Вектор используется для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, в клетку–хозяина для амплификации нуклеиновой кислоты или для экспрессии/демонстрации полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой. Векторы

обычно остаются эписомальными, но могут быть сконструированы для осуществления интеграции гена или его части в хромосому генома. Также рассматриваются векторы, которые являются искусственными хромосомами, такие как дрожжевые искусственные хромосомы и искусственные хромосомы млекопитающих. Выбор и использование таких транспортных средств хорошо известны специалистам в данной области. Вектор также включает «вирусные векторы» и «вирусные векторы».

Используемый в настоящем документе термин «вектор экспрессии» включает векторы, способные экспрессировать ДНК, которые функционально связаны с регуляторными последовательностями, такими как промоторные области, которые способны влиять на экспрессию таких фрагментов ДНК. Такие дополнительные сегменты могут включать последовательности промотора и терминатора и, необязательно, могут включать один или несколько ориджинов репликации, один или несколько селективируемых маркеров, энхансер, сигнал полиаденилирования и тому подобное. Векторы экспрессии обычно происходят от плазмидной или вирусной ДНК или могут содержать элементы обоих. Таким образом, вектор экспрессии относится к рекомбинантной конструкции ДНК или РНК, такой как плазида, фаг, рекомбинантный вирус или другой вектор, который при введении в соответствующую клетку–хозяина приводит к экспрессии клонированной ДНК. Подходящие векторы экспрессии хорошо известны специалистам в данной области и включают те, которые реплицируются в эукариотических клетках и/или прокариотических клетках, и те, которые остаются эписомальными, или те, которые интегрируются в геном клетки–хозяина.

Используемый в настоящем документе вектор также включает «вирусные векторы» или «вирусные векторы». Вирусные векторы представляют собой сконструированные вирусы, эукариотические и прокариотические, которые могут содержать гетерологичную нуклеиновую кислоту для осуществления ее переноса и экспрессии в клетках–хозяевах. Вирусные векторы характеризуются как эукариотические и прокариотические на основе хозяина, инфицированного вирусом, из которого происходит вектор, и типа РНК – полимеразы (эукариотической или прокариотической), которая распознает вирусные промоторы. Следовательно, например, вектор, полученный из аденовируса, является эукариотическим вектором.

Используемый в настоящем документе термин «аденовирус» относится к любой группе ДНК–содержащих вирусов, которые вызывают конъюнктивит и инфекции верхних дыхательных путей у людей. Используемый здесь термин «голая ДНК» относится к ДНК без гистонов, которую можно использовать для вакцин и генной терапии. Голая ДНК – это генетический материал, который передается от клетки к клетке во время обработки

переноса гена, называемой трансформацией. При трансформации очищенная или голая ДНК захватывается клеткой–реципиентом, что придает клетке–реципиенту новую характеристику или фенотип.

Используемый в настоящем документе термин «функционально связанный» со ссылкой на последовательности, области, элементы или домены нуклеиновой кислоты означает, что области нуклеиновой кислоты функционально связаны друг с другом. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая лидерный пептид, может быть функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, посредством чего нуклеиновые кислоты могут транскрибироваться и транслироваться для экспрессии функционального слитого белка, где лидерный пептид влияет на секрецию слитого полипептида. В некоторых случаях нуклеиновая кислота, кодирующая первый полипептид (например, лидерный пептид), функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей второй полипептид, и нуклеиновые кислоты транскрибируются как один транскрипт мРНК, но трансляция транскрипта мРНК может привести к одному двух экспрессируемых полипептидов. Например, янтарный стоп–кодон может быть расположен между нуклеиновой кислотой, кодирующей первый полипептид, и нуклеиновой кислотой, кодирующей второй полипептид, так что при введении в клетку, частично подавляющую янтарь, полученный в результате одиночный транскрипт мРНК может транслироваться для получения либо слитый белок, содержащий первый и второй полипептиды, или может быть транслирован для получения только первого полипептида. В другом примере промотор может быть функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, посредством чего промотор регулирует или опосредует транскрипцию нуклеиновой кислоты.

Используемый в настоящем документе термин «первичная последовательность» относится к последовательности аминокислотных остатков в полипептиде или последовательности нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты.

Используемый в настоящем документе термин «последовательность связывания белка» относится к белковой или пептидной последовательности, которая способна специфически связываться с другими белковыми или пептидными последовательностями в целом, с набором белковых или пептидных последовательностей или с конкретной белковой или пептидной последовательностью.

Используемый в настоящем документе термин «метка» или «метка эпитопа» относится к последовательности аминокислот, обычно добавляемой к N– или C–концу полипептида, такого как MTSP–1, предоставленный в данном документе. Включение меток, слитых с полипептидом, может облегчить очистку и/или обнаружение полипептида.

Как правило, метка или полипептид метки относится к полипептиду, который имеет достаточное количество остатков для обеспечения эпитопа, распознаваемого антителом, или может служить для обнаружения или очистки, но является достаточно коротким, чтобы он не влиял на активность полипептида, к которому он относится. связаны между собой. Полипептид – метка обычно является достаточно уникальным, так что антитело, которое специфически связывается с ним, по существу не перекрестно реагирует с эпитопами в полипептиде, с которым оно связано. Белки, меченные эпитопом, могут быть очищены аффинно с использованием высокоспецифичных антител против меток.

Подходящие полипептиды–метки обычно имеют по меньшей мере 5 или 6 аминокислотных остатков и обычно между 8–50 аминокислотными остатками, обычно между 9–30 остатками. Метки могут быть связаны с одним или несколькими белками и позволяют обнаруживать белок или его извлечение из образца или смеси. Такие теги хорошо известны и могут быть легко синтезированы и разработаны. Примеры полипептидов–меток включают полипептиды, используемые для аффинной очистки, и включают в себя метки Small Ubiquitin–like модификатора (SUMO), метки FLAG, His–метки, полипептид метки гемагглютинина (HA) и его антитело 12CA5 [20]; метка с–тус и антитела к 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 и 9E10 [21]; и метка гликопротеина D (gD) вируса простого герпеса и его антитело [22]. Антитело, используемое для обнаружения меченного эпитопом антитела, обычно называют здесь вторичным антителом.

Как используется в настоящем документе, последовательность связывания металла относится к последовательности белка или пептида, которая способна специфически связываться с ионами металла в целом, с набором ионов металла или с конкретным ионом металла.

Используемый в настоящем документе термин «оценка» предназначен для включения количественного и качественного определения в смысле получения абсолютного значения активности протеазы или ее домена, присутствующего в образце, а также получения индекса, соотношения, процента, визуального или другого значения, указывающего на уровень активности.

Оценка может быть прямой или косвенной, и фактически обнаруженные химические вещества не обязательно должны быть самим продуктом протеолиза, но могут, например, быть его производным или некоторым другим веществом. Например, обнаружение продукта расщепления белка комплемента, такого как SDS–PAGE, и окрашивание белка Кумасси синим.

Используемый в настоящем документе термин «биологическая активность» относится к активности соединения *in vivo* или физиологическим реакциям, которые

возникают в результате введения соединения, композиции или другой смеси *in vivo*. Биологическая активность, таким образом, охватывает терапевтические эффекты и фармацевтическую активность таких соединений, композиций и смесей. Биологические активности можно наблюдать в системах *in vitro*, предназначенных для тестирования или использования таких активностей. Таким образом, для целей настоящего изобретения биологическая активность протеазы представляет собой ее каталитическую активность, при которой полипептид гидролизует.

Используемый в настоящем документе термин «эквивалент», когда он относится к двум последовательностям нуклеиновых кислот, означает, что две рассматриваемые последовательности кодируют одну и ту же последовательность аминокислот или эквивалентных белков. Когда эквивалент используется в отношении двух белков или пептидов, это означает, что два белка или пептида имеют практически одинаковую аминокислотную последовательность только с аминокислотными заменами (такими как, но не ограничиваясь ими, консервативные изменения, такие как те, которые приведены в настоящем документе, в частности в Таблице 3), которые существенно не изменяют активность или функцию белка или пептида. Когда эквивалент относится к свойству, свойство не обязательно должно присутствовать в одинаковой степени (например, два пептида могут демонстрировать разные скорости ферментативной активности одного и того же типа), но активности обычно по существу одинаковы. Комплементарность, когда ссылаются на две нуклеотидные последовательности, означает, что две последовательности нуклеотидов способны гибридизоваться, как правило, с несовпадением менее 25%, 15% или 5% между противоположными нуклеотидами. При необходимости будет указан процент комплементарности. Обычно две молекулы выбраны так, что они будут гибридизоваться в условиях высокой строгости.

Как используется в настоящем документе, агент, модулирующий активность белка или экспрессию гена или нуклеиновой кислоты, либо уменьшает, либо увеличивает, либо иным образом изменяет активность белка, либо, каким-либо образом, усиливает или понижает регуляцию или иным образом изменяет экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке.

Используемый в настоящем документе термин «химерный белок» или «слитый белок» относится к полипептиду, функционально связанному с другим полипептидом. Химерный или слитый белок, представленный в настоящем документе, может включать одну или несколько протеаз или их часть, такую как их одноцепочечные протеазные домены, и один или несколько других полипептидов для любого одного или нескольких сигналов транскрипционного/трансляционного контроля, сигнальных

последовательностей, а также включать метки для локализации – метка для очистки, часть домена иммуноглобулина G и/или нацеливающий агент. Эти химерные или слитые белки включают белки, полученные рекомбинантными способами в виде слитых белков, белки, полученные химическими способами, такими как химическое связывание, например, посредством сочетания с сульфгидрильными группами, и белки, полученные любым другим способом, посредством которого по меньшей мере одна протеаза, или ее часть, прямо или косвенно связана через линкер(ы) с другим полипептидом.

Используемый в настоящем документе термин «функционально связанный» при ссылке на слитый белок относится к полипептиду протеазы и непротеазному полипептиду, которые слиты в рамке друг с другом. Непротеазный полипептид может быть слит с N-концом или C-концом протеазного полипептида.

Используемый в настоящем документе нацеливающий агент представляет собой любой фрагмент, такой как белок или его эффективная часть, который обеспечивает специфическое связывание конъюгата с рецептором клеточной поверхности, который в некоторых случаях может интернализировать связанные конъюгаты или их части. Нацеливающий агент также может быть агентом, который стимулирует или облегчает, например, аффинную изоляцию или очистку конъюгата; прикрепление конъюгата к поверхности; или обнаружение конъюгата или комплексов, содержащих конъюгат.

Используемый в настоящем документе термин «линкер» относится к коротким последовательностям аминокислот, которые соединяют два полипептида (или нуклеиновую кислоту, кодирующую такие полипептиды). «Пептидный линкер» относится к короткой последовательности аминокислот, соединяющей две полипептидные последовательности. Примерами полипептидных линкеров являются линкеры, соединяющие две цепи антитела в синтетическом фрагменте антитела, таком как фрагмент scFv. Линкеры хорошо известны, и любые известные линкеры могут быть использованы в предоставленных способах. Примерами полипептидных линкеров являются (Gly-Ser) *n* аминокислотные последовательности с некоторыми остатками Glu или Lys, диспергированными повсюду для увеличения растворимости. Другие примерные линкеры описаны здесь; любой из этих и других известных линкеров может быть использован с предоставленными композициями и способами.

Используемый в настоящем документе термин «производное или аналог молекулы» относится к части, полученной из молекулы или к модифицированной версии молекулы.

Используемый в настоящем документе термин «заболевание или расстройство» относится к патологическому состоянию в организме, причиной или результатом которого являются состояния, включая, но не ограничиваясь ими, инфекции, приобретенные

состояния, генетические состояния, состояния, связанные с воздействием окружающей среды и поведением человека, и состояния, характеризующиеся идентифицируемыми симптомами.

Заболевания или расстройства включают клинически диагностируемое заболевание, а также нарушение нормального состояния организма, которое не было диагностировано как клиническое заболевание.

Согласно настоящему документу, заболеваниями и расстройствами, представляющими интерес, являются те, которые включают активацию комплемента, в том числе те, которые опосредованы активацией комплемента, и те, в которых активация комплемента играет роль в этиологии или патологии. Заболевания и расстройства, представляющие интерес, включают в себя те, которые характеризуются активацией комплемента (например, возрастная макулярная дегенерация и отсроченная функция трансплантата почки).

Как используется в настоящем документе, дегенерация желтого пятна происходит, когда малая центральная часть сетчатки, известная как макула, разрушается. Существует два типа AMD: сухая (атрофическая) и влажная (неоваскулярная или экссудативная). Большинство AMD начинается как сухой тип и у 10–20% людей, это прогрессирует до влажного типа. Возрастная дегенерация желтого пятна всегда двусторонняя (то есть происходит на обоих глазах), но не обязательно прогрессирует с одинаковой скоростью на обоих глазах.

В настоящем документе возрастная дегенерация желтого пятна (AMD) представляет собой воспалительное заболевание, которое вызывает нарушения зрения и слепоту у пожилых людей. Белки системы комплемента являются центральными в развитии этого заболевания. Местное и системное воспаление при AMD опосредовано дерегулированным действием альтернативного пути системы комплемента.

Как используется в настоящем документе, отсроченная функция трансплантата (DGF) является проявлением острого повреждения почек (ОПП) с признаками, уникальными для процесса трансплантации. Это происходит после трансплантации хирургии. Отсроченная функция трансплантата (DGF) является распространенным осложнением, часто определяемым как потребность в диализе в течение первой недели после трансплантации.

Собственный почечный синтез третьего компонента C3 (C3) комплемента способствует острому отторжению, вызывая Т-клеточный ответ. Например, у мертвых доноров головного мозга локальные уровни C3 в почках выше при закупках и обратно связаны с почечной функцией через 14 дней после трансплантации.

Как используется в настоящем документе, заболевание или расстройство, опосредованное комплементом, представляет собой любое расстройство, в котором любой один или несколько белков комплемента играет роль в заболевании, либо вследствие отсутствия или присутствия белка комплемента или белка, связанного с комплементом, либо активации, либо инактивации комплемента или белка, связанного с комплементом. В некоторых вариантах осуществления расстройство, опосредованное комплементом, представляет собой расстройство, вызванное дефицитом белка (ов) комплемента. В других вариантах осуществления, как описано в настоящем документе, расстройство, опосредованное комплементом, представляет собой заболевание, которое обусловлено активацией или чрезмерной активацией белка (ов) комплемента. Расстройство, опосредованное комплементом, также является нарушением, обусловленным присутствием любого одного или нескольких из белков комплемента и/или продолжающейся активацией пути комплемента.

Используемый здесь термин «расстройство, связанное с дегенерацией желтого пятна» относится к любому из ряда состояний, при которых макула сетчатки дегенерирует или становится дисфункциональной (например, вследствие уменьшения роста клеток макулы, повышенной гибели или перестройки клеток макулы (например, RPE), потеря нормальной биологической функции или комбинация этих событий). Дегенерация желтого пятна приводит к потере целостности гистоархитектуры клеток и/или внеклеточного матрикса нормальной макулы и/или потере функции клеток макулы. Примеры связанных с дегенерацией желтого пятна расстройств включают возрастную макулярную дегенерацию (AMD), географическую атрофию (GA), макулярную дистрофию Северной Каролины, дистрофию глазного дна Сорсби, болезнь Старгардта, патологическую дистрофию, болезнь Беста, доминантный друз и *malattia leventinese* (лучевой/радиальный друз). Расстройство, связанное с дегенерацией желтого пятна, также включает экстрамакулярные изменения, которые происходят до или после дисфункции и/или дегенерации желтого пятна. Таким образом, термин «расстройство, связанное с дегенерацией желтого пятна» также широко включает любое состояние, которое изменяет или нарушает целостность или функцию макулы (например, повреждение пигментного эпителия сетчатки (RPE) или мембраны Бруха). Например, термин охватывает отслоение сетчатки, хориоретинальные дегенерации, дегенерации сетчатки, фоторецепторные дегенерации, RPE-дегенерации, мукополисахаридозы, дистрофии палочек-колбочек, дистрофии палочек-колбочек и дегенерации колбочек.

Расстройство, связанное с дегенерацией желтого пятна, описанное в настоящем документе, включает AMD, такое как, например, расстройство, связанное с дегенерацией

желтого пятна, леченное обработкой против VEGF, такое как, например, антитела против VEGF, или лазерное лечение, или имплантируемый телескоп.

Используемый в настоящем документе термин «лечение» субъекта заболеванием или состоянием означает, что симптомы субъекта частично или полностью ослаблены или остаются неизменными после лечения. Следовательно, лечение включает профилактику, терапию и/или лечение.

Профилактика относится к предотвращению потенциального заболевания и/или предотвращению ухудшения симптомов или прогрессирования заболевания. Лечение также охватывает любое фармацевтическое применение модифицированного полипептида MTSP-1 и композиций, представленных в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин «профилактика» или «профилактика» относится к способам, в которых снижается риск или вероятность развития заболевания или состояния.

Используемый в настоящем документе термин «терапевтический агент», терапевтический режим, радиозащитный агент или химиотерапевтическое средство означает обычные лекарственные средства и лекарственную терапию, включая вакцины, которые известны специалистам в данной области. Радиотерапевтические агенты хорошо известны в данной области.

Используемый в настоящем документе термин «лечение» означает любой способ, при котором симптомы состояния, расстройства или заболевания улучшаются или иным образом благоприятно изменяются.

Лечение также охватывает любое фармацевтическое применение композиций, описанных в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин «улучшение симптомов» конкретного заболевания или расстройства путем лечения, такого как введение фармацевтической композиции или другого терапевтического средства, относится к любому ослаблению, постоянному или временному, длительному или временному, симптомов, которые может быть отнесено или связано с введением композиции или терапевтического средства.

Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически эффективный агент» включает в себя любой терапевтический агент или биоактивные агенты, включая, но не ограничиваясь ими, например, анестетики, вазоконстрикторы, диспергирующие агенты и обычные терапевтические препараты, включая низкомолекулярные препараты и терапевтические белки.

Как используется в настоящем документе, «эффективное количество» соединения или композиции для лечения конкретного заболевания представляет собой количество, которое является достаточным для ослабления или для некоторого уменьшения симптомов, связанных с заболеванием. Такое количество можно вводить в виде однократной дозы или можно вводить в соответствии с режимом, при котором оно эффективно. Это количество может вылечить заболевание, но, как правило, его вводят для ослабления симптомов заболевания. Как правило, повторное введение требуется для достижения желаемого улучшения симптомов.

Используемый в настоящем документе термин «терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» относится к количеству агента, соединения, материала или композиции, содержащему соединение, которого по меньшей мере достаточно для создания терапевтического эффекта после введения субъекту. Следовательно, это количество, необходимое для предотвращения, лечения, улучшения, остановки или частичного прекращения симптома заболевания или расстройства.

Используемый в настоящем документе термин «терапевтический эффект» означает эффект, возникающий в результате лечения субъекта, который обычно изменяет, обычно улучшает или облегчает симптомы заболевания или состояния или излечивает заболевание или состояние.

Используемый в настоящем документе термин «профилактически эффективное количество» или «профилактически эффективная доза» относится к количеству агента, соединения, материала или композиции, содержащему соединение, которое при введении субъекту оказывает намеченный профилактический эффект, например предотвращение или отсрочку появления или повторения заболевания или симптомов, уменьшение вероятности возникновения или повторения заболевания или симптомов, или снижение частоты вирусной инфекции. Полный профилактический эффект не обязательно происходит при введении одной дозы и может происходить только после введения серии доз. Таким образом, профилактически эффективное количество может быть введено за одно или несколько введений.

Используемый в настоящем документе термин «введение не-комплементной протеазы», такой как модифицированная протеаза MTSP-1, относится к любому способу, в котором не-комплементная протеаза (т. е. не относящаяся к комплементу) контактирует с ее субстратом. Введение может быть осуществлено *in vivo* или *ex vivo* или *in vitro*. Например, для введения *ex vivo* жидкость организма, такую как кровь, удаляется от субъекта и контактирует вне организма с модифицированной протеазой без комплемента, такой как модифицированная протеаза MTSP-1. Для введения *in vivo* модифицированная

некомплементарная протеаза, такая как модифицированная протеаза MTSP-1, может быть введена в организм, например, местным, наружным, системным и/или другим путем введения. Введение *in vitro* включает способы, такие как способы культивирования клеток.

Используемый в настоящем документе термин «единичная доза» относится к физически дискретным единицам, подходящим для людей и животных и упакованным индивидуально, как известно в данной области.

Используемый в настоящем документе термин «пациент» или «субъект», подлежащий лечению, включает людей и животных или животных, не являющихся людьми. Млекопитающие включают; приматов, таких как, люди, шимпанзе, гориллы и обезьяны; домашних животных, таких как, собаки, лошади, кошки, свиньи, козы и коровы; и грызунов, таких как мыши, крысы, хомяки и песчанки.

Используемый в настоящем документе термин «комбинация» относится к любой ассоциации между двумя или более объектами. Ассоциация может быть пространственной или относиться к использованию двух или более элементов для общей цели. Комбинация может быть двумя или более отдельными предметами, такими как две композиции или две коллекции, их смесью, такой как единственная смесь двух или более предметов, или любым их вариантом. Элементы комбинации, как правило, функционально связаны или ассоциированы между собой.

Используемый в настоящем документе термин «композиция» относится к любой смеси двух или более продуктов или соединений (например, агентов, модуляторов, регуляторов и т. д.). Это может быть раствор, суспензия, жидкость, порошок, паста, водные или неводные составы или любая их комбинация.

Используемый в настоящем документе термин «стабилизирующий агент» относится к соединению, добавленному в состав для защиты либо антигена, либо конъюгата, например, в условиях (например, при температуре), при которых составы, содержащиеся здесь, хранятся или используются. Таким образом, включены агенты, которые предотвращают деградацию белков от других компонентов в композициях. Примерами таких агентов являются аминокислоты, производные аминокислот, амины, сахара, полиолы, соли и буферы, поверхностно-активные вещества, ингибиторы или субстраты и другие агенты, как описано здесь.

Используемый в настоящем документе термин «жидкость» относится к любой композиции, которая может течь. Таким образом, жидкости включают композиции, которые находятся в форме полутвердых веществ, паст, растворов, водных смесей, гелей, лосьонов, кремов и других подобных композиций.

Используемый в настоящем документе термин «изделие» представляет собой продукт, который производится и продается. Используемый в данной заявке термин предназначен для охвата терапевтического агента с модифицированным полипептидом MTSP-1 или молекулой нуклеиновой кислоты, содержащейся в тех же или отдельных упаковочных изделиях.

Используемый в настоящем документе термин «набор» относится к упакованной комбинации, необязательно включающей реагенты и другие продукты и/или компоненты для практических методов, использующих элементы комбинации. Например, наборы, содержащие модифицированный протеазный полипептид, такой как модифицированная протеаза MTSP-1, представленная здесь, или молекула нуклеиновой кислоты, представленная здесь, и другой объект для целей, включающих, но не ограничивающейся этим, введение, диагностику и оценку биологической активности, или свойства, как представлено в настоящем документе. Наборы могут дополнительно включать инструкции по применению.

Используемый в настоящем документе термин «клеточный экстракт» относится к препарату или фракции, которая изготовлена из лизированной или разрушенной клетки.

Используемый здесь термин «животное» включает любое животное, такое как, но не ограничиваясь этим; приматы, включая людей, горилл и обезьян; грызуны, такие как мыши и крысы; птицы, такие как цыплята; жвачные животные, такие как козы, коровы, олени и овцы. Животные, не являющиеся людьми, исключают людей как рассматриваемое животное. Протеазы, раскрытые в данном документе, могут быть получены из любого источника, животного, растительного, прокариотического и грибкового. Большинство протеаз – это протеазы животного происхождения, в том числе протеазы млекопитающих.

Используемый в настоящем документе термин «однократная дозировка» относится к составу, содержащему разовую дозу терапевтического агента для прямого введения. Однократные лекарственные формы обычно не содержат консервантов.

Используемый в настоящем документе термин «многодозовая композиция» относится к составу, который содержит несколько доз терапевтического агента и который может быть непосредственно введен для обеспечения нескольких разовых доз терапевтического агента. Дозы могут вводиться в течение минут, часов, недель, дней или месяцев. Многодозовые составы могут обеспечивать корректировку дозы, объединение доз и/или разделение дозы. Поскольку многодозовые составы используются с течением времени, они обычно содержат один или несколько консервантов для предотвращения роста микробов.

Используемый в настоящем документе термин «контроль» или «стандарт» относится к образцу, который по существу идентичен тестируемому образцу, за исключением того, что он не лечится тестовым параметром или, если это образец плазмы, то он может быть получен из нормального волонтера, не подверженного интересующему состоянию. Контроль также может быть внутренним контролем. Например, элементом контроля может быть образец, например вирус, который обладает известным свойством или активностью.

Как используется в настоящем документе, формы единственного числа включают множественные ссылки, если контекст явно не предписывает иное. Так, например, ссылка на «агент» включает в себя один или несколько агентов.

Используемый в настоящем документе термин «или» используется для обозначения «и/или», если явно не указано, что он относится только к альтернативам или если альтернативы являются взаимоисключающими.

Как используется в настоящем документе, диапазоны и количества могут быть выражены как «примерно» точное значение или диапазон или как «около» точного значения или диапазона. «Примерно» или «около» также включает в себя точное значение. Следовательно, «около 5 оснований» означает «около 5 оснований», а также «5 оснований».

Используемый в настоящем документе термин «необязательный» или «необязательно» означает, что описанное впоследствии событие или обстоятельство происходит или не происходит, и что описание включает в себя случаи, когда указанное событие или обстоятельство происходит, и случаи, когда это не происходит. Например, необязательно замещенная группа означает, что группа является незамещенной или замещенной.

Используемые в настоящем документе аббревиатуры для любых защитных групп, аминокислот и других соединений, если не указано иное, соответствуют их общему использованию, признанным аббревиатурам или Комиссии IUPAC–IUB по биохимической номенклатуре [23].

Для ясности раскрытия, а не в качестве ограничения, подробное описание разделено на следующие подразделы.

Б. СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ MTSP–1

MTSP–1 (также называемый матриптазой, TADG–15, супрессором онкогенности 14, ST14; см. SEQ ID NO: 1, 2 и регистрационные номера GenBank: AF118224 и AAD42765; патент US № 5792616; а также [24]) представляет собой сериновую протеазу, которая расщепляет белки, содержащие аминокислотную последовательность P4(Arg/Lys)–P3(X)–

P2(Ser)–P1(Arg)–P1'(Ala) и P4(X)–P3(Arg/Lys)–P2(Ser)–P1(Arg)–P1'(Ala), где X соответствует неосновным аминокислотам [25] и может расщеплять различные синтетические субстраты с остатками аргинина или лизина в P1 сайтах. MTSP–1 содержит по меньшей мере три известных физиологических субстрата, включая активатор плазминогена урокиназного типа (uPA), фактор роста гепатоцитов (HGF)/рассеивающий фактор (SF) и активированный протеазой рецептор–2 (PAR–2) [26]. MTSP–1 обнаружен в эпителиальных клетках и во многих раковых тканях. MTSP–1 участвует в нормальном эмбриональном развитии. MTSP–1 совместно локализуется с E–кадгеринном, молекулой плотных контактов, которая необходима для нормального эмбрионального развития у мышей.

В данном документе представлены модифицированные полипептиды сериновой протеазы 1 (MTSP–1) мембранного типа, которые модифицированы таким образом, что они расщепляют ингибирующие последовательности в C3, так что активация C3 в фрагментах C3a и C3b ингибируется. Активность/специфичность модифицированных полипептидов MTSP–1, представленных в настоящем документе, такова, что они расщепляют C3 с большей активностью и/или специфичностью или k_{cat}/K_m по сравнению с немодифицированным полипептидом MTSP–1, особенно любого из SEQ ID NO: 1–4. Модифицированные полипептиды MTSP–1 также могут иметь пониженную активность или специфичность, или то и другое для физиологического субстрата немодифицированного полипептида MTSP–1, такого как, например, активируемый протеиназой рецептор–2 (PAR–2), активатор плазминогена урокиназного типа (uPA) и/или фактор роста гепатоцитов (HGF). Таким образом, модифицированные полипептиды MTSP–1, раскрытые в данном документе, ингибируют активацию комплемента в пути комплемента. Модифицированные полипептиды MTSP–1 также проявляют повышенную селективность в отношении расщепления C3 по сравнению с другими субстратами MTSP–1, такими как, например, активируемый протеиназой рецептор–2 (PAR–2), активатор плазминогена урокиназного типа (uPA) и/или фактор роста гепатоцитов (HGF). Следовательно, модифицированные полипептиды MTSP–1, раскрытые в данном документе, не проявляют нежелательных расщепляющих активностей в отношении физиологических нативных субстратов MTSP–1, так что они не проявляют нежелательных побочных эффектов.

1. Сериновые протеазы

Сериновые протеазы (SPs), которые включают в себя секретируемые ферменты и ферменты, секвестрируемые в цитоплазматических органеллах–хранилищах, выполняют различные физиологические функции, в том числе в отношении свертывания крови,

заживления ран, пищеварения, иммунных реакций и инвазии опухоли и метастазирования. Например, химотрипсин, трипсин и эластаза функционируют в пищеварительном тракте; Фактор 10, Фактор 11, Тромбин и Плазмин участвуют в свертывании крови и заживлении ран; и C1r, C1s и C3-конвертазы играют роль в активации комплемента.

Класс белков на клеточной поверхности, обозначаемый трансмембранными сериновыми протеазами типа II, представляет собой протеазы, которые являются мембранно-закрепленными белками с внеклеточными доменами. Как белки клеточной поверхности, они играют роль во внутриклеточной передаче сигнала и в опосредовании протеолитических событий на клеточной поверхности. Другие сериновые протеазы связаны с мембраной и функционируют аналогичным образом. Другие являются секретируемыми. Многие сериновые протеазы проявляют свою активность при связывании с рецепторами клеточной поверхности и, следовательно, действуют на клеточных поверхностях. Протеолиз клеточной поверхности представляет собой механизм для генерации биологически активных белков, которые опосредуют различные клеточные функции.

Сериновые протеазы, в том числе секретируемые и трансмембранные сериновые протеазы, участвуют в процессах, которые включают развитие и прогрессирование опухолей. Хотя точная роль этих протеаз не была полностью проработана, известно, что сериновые протеазы и их ингибиторы участвуют в контроле многих внутри- и внеклеточных физиологических процессов, включая деградиционные действия при инвазии раковых клеток и метастатическом распространении, а также включая неоваскуляризацию опухолей, которая вовлечена в их прогрессирование. Протеазы участвуют в деградаци и ремоделировании внеклеточного матрикса (ECM), способствуют ремоделированию тканей и необходимы для инвазии рака и метастазирования. Было показано, что активность и/или экспрессия некоторых протеаз коррелирует(ют) с прогрессированием и развитием опухоли.

Было идентифицировано более 20 семейств (обозначенных S1–S27) сериновых протеаз, и они сгруппированы в 6 кланов (SA, SB, SC, SE, SF и SG) на основе структурного сходства и других функциональных данных [51]. Существуют сходства в механизмах реакции нескольких сериновых пептидаз. Клань химотрипсина, субтилизина и карбоксипептидазы С имеют общую каталитическую триаду серина, аспартата и гистидина: серин действует как нуклеофил, аспартат – как электрофил, а гистидин – как основание. Геометрические ориентации каталитических остатков схожи между семействами, несмотря на разную укладку белков (фолдинг). Линейное расположение каталитических остатков обычно отражает клановые отношения. Например, в клане химотрипсина (SA) каталитические остатки серина, аспартата и гистидина в каталитической триаде

расположены в порядке HDS, а в кланах субтилизина (SB) и карбоксипептидазы (SC) каталитические остатки расположены в порядке DHS и SDH соответственно.

Примеры сериновых протеаз суперсемейства химотрипсина включают активатор плазминогена тканевого типа (tPA), трипсин, трипсиноподобную протеазу, химотрипсин, плазмин, эластазу, урокиназу (или активатор плазминогена урокиназного типа, uPA), акрозин, активированный С белок C1-эстераза, катепсин G, химаза и протеазы каскада свертывания крови, включая калликреин, тромбин и факторы VIIa, IXa, Xa, XIa и XIIa [24–31].

Активность протеаз в семействе сериновых протеаз зависит от набора аминокислотных остатков, которые образуют их активный сайт. Одним из остатков всегда является серин; отсюда их обозначение как сериновых протеаз. Например, химотрипсин, трипсин и эластаза имеют сходную структуру, и их активный остаток серина находится в одинаковом положении (Ser–195). Несмотря на их сходство, они имеют разные субстратные особенности и расщепляют различные пептидные связи во время расщепления белка. Например, химотрипсин предпочитает ароматическую боковую цепь на остатке, у которого карбонильный углерод является частью пептидной связи, которая будет расщепляться ферментом. Трипсин предпочитает положительно заряженные остатки Lys или Arg в этой позиции. Сериновые протеазы заметно различаются по свойствам распознавания субстрата: некоторые являются высокоспецифичными (то есть протеазы, участвующие в свертывании крови и системе иммунного комплемента); некоторые являются только частично специфичными (то есть пищеварительные протеазы млекопитающих трипсин и химотрипсин); а другие, такие как субтилизин и бактериальная протеаза, совершенно неспецифичны. Несмотря на различия в специфичности, каталитический механизм сериновых протеаз хорошо сохраняется.

Механизм расщепления белка–мишени сериновой протеазой основан на нуклеофильной атаке целевой пептидной связи серином. Молекулы цистеина, треонина или воды, связанные с аспартатом или металлами, также могут играть эту роль. Во многих случаях нуклеофильные свойства группы улучшаются благодаря присутствию гистидина, удерживаемого аспартатом в «акцепторном состоянии протона». Выровненные боковые цепи серина, гистидина и аспартата образуют каталитическую триаду, общую для большинства сериновых протеаз. Например, остатки активного сайта химотрипсина и сериновых протеаз, которые являются членами того же семейства, что и химотрипсин, такие как, например, MTSP–1, представляют собой Asp102, His57 и Ser195.

Каталитические домены всех сериновых протеаз суперсемейства химотрипсина имеют гомологию последовательности и структурную гомологию. Гомология

последовательности включает в себя сохранение: 1) характерных остатков активного сайта (например, Ser195, His57 и Asp102 в случае трипсина); 2) отверстие оксианиона (например, Gly193, Asp194 в случае трипсина); и 3) остатки цистеина, которые образуют дисульфидные мостики в структуре [32]. Структурная гомология включает: 1) общую укладку, характеризующуюся двумя структурами, имеющими топологию греческого ключа [33]; 2) общее расположение каталитических остатков; и 3) детальное сохранение структуры внутри ядра молекулы [34].

Во всем семействе сериновых протеаз химотрипсина взаимодействие основной цепи между субстратом и ферментом полностью сохраняется, но взаимодействия боковой цепи значительно различаются. Идентичность аминокислот, которые содержат карманы S1 – S4 активного сайта, определяет субстратную специфичность этого конкретного кармана. Прививка аминокислот из одной сериновой протеазы к другой в одном и том же, соответствующем, фолде изменяет ее специфичность. Как правило, аминокислоты протеазы, содержащей карманы S1 – S4, представляют собой аминокислоты, которые имеют боковые цепи в пределах от 4 до 5 ангстрем от субстрата. Взаимодействия этих аминокислот с субстратом протеазы обычно называют взаимодействиями «первой оболочки», поскольку они непосредственно контактируют с субстратом. Однако могут существовать взаимодействия «второй оболочки» и «третьей оболочки», которые в конечном итоге позиционируют аминокислоты первой оболочки. Эффекты связывания субстрата первой оболочки и второй оболочки определяются, в основном, петлями между доменами типа бета-цилиндр (beta-barrel). Поскольку эти петли не являются основными элементами белка, целостность фолда сохраняется, в то время как варианты петель с новыми специфическими субстратными свойствами могут быть выбраны в ходе эволюции для заполнения необходимых метаболических или регуляторных ниш на молекулярном уровне. Обычно для сериновых протеаз следующие аминокислоты, указанные по химотрипсиновой нумерации, в первичной последовательности являются детерминантами специфичности: 195, 102, 57 (каталитическая триада); 189, 190, 191, 192 и 226 (S1); 57 – петля между 58 и 64 и 99 (S2); 192, 217, 218 (S3); петля между Cys168 и Cys180, 215 и 97–100 (S4); и 41 и 151 (S2'), где аминокислота в положении S1 влияет на специфичность P1, аминокислота в положении S2 влияет на специфичность P2, аминокислота в положении S3 влияет на специфичность P3, и аминокислота в положении S4 влияет на специфичность P4. Позиция 189 в сериновой протеазе представляет собой остаток, погруженный в нижнюю часть кармана, который определяет специфичность S1. Структурные детерминанты для MTSP-1 перечислены в таблице 4, причем домены протеазы для каждой из обозначенных протеаз выровнены с доменом протеазы химотрипсина. Число под заголовками столбцов

Cys168–Cys182 и петле 60 указывает количество аминокислот в петле между двумя аминокислотами и в петле соответственно. Обозначение «да/нет» под столбцом с заголовком Cys191–Cys220 указывает на наличие дисульфидного мостика в протеазе. Эти области являются вариабельными в семействе химотрипсин–подобных сериновых протеаз и сами по себе представляют структурные детерминанты.

2. Структура

КДНК MTSP–1 клонировали из различных видов млекопитающих. Типичные полипептиды–предшественники MTSP–1 включают, но не ограничиваются ими, MTSP–1 полипептиды человека (SEQ ID NO: 1 и кодируемого SEQ ID NO: 5), мыши (SEQ ID NO: 12) и крысы (SEQ ID NO: 13). Транскрипт мРНК MTSP–1 человека обычно транслируется с образованием белка дикого типа из 855 аминокислот (SEQ ID NO: 1). Молекула нуклеиновой кислоты, последовательность которой приведена в SEQ ID NO: 5 (см. также Genbank AF118224), кодирует 855 аминокислот MTSP–1 (SEQ ID NO: 1, GenBank AAD42765). MTSP–1 представляет собой мультидоменную протеиназу с С–концевым доменом сериновой протеиназы [35]. Был выделен вариант протеазы из 683 аминокислот, но этот белок, по–видимому, представляет собой усеченную форму или форму эктодомена. Как более подробно описано ниже, MTSP–1 представляет собой зимоген или профермент, который дополнительно обрабатывался протеолитическим расщеплением по каноническому мотиву активации для получения двухцепочечного зрелого полипептида MTSP–1.

Существует по меньшей мере пять изоформ, полученных альтернативным сплайсингом MTSP–1 человека. Были обнаружены формы MTSP–1 с молекулярной массой приблизительно 95, 78, 74, 45 и 25 кДа, соответствующие полноразмерному белку (95 кДа), с аминокислотными остатками 149–855 SEQ ID NO: 1 (78 кДа), остатками 190–855 SEQ ID NO: 1 (73 кДа) или 205–855 SEQ ID NO: 1 (74 кДа), остатками 190–614 SEQ ID NO: 1 (45,7 кДа) и остатками 615–855 SEQ ID NO: 1 (26 кДа), соответственно [36]. Известны аллельные варианты и другие варианты человеческого MTSP–1. Например, встречающийся в природе вариант G827R связан с ихтиозным гипотрихозным синдромом (ихтиоз с гипотрихозом синдром), характеризующимся гиперкератозом кожи [37]. Другим примером является модифицированный полипептид MTSP–1, содержащий аминокислотную модификацию C299S (C122S по химотрипсиновой нумерации) в последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 1 (соответствует последовательности аминокислот, изложенной в SEQ ID NO: 2), где замена свободного цистеина уменьшает агрегацию кодируемого белка. Дополнительные варианты включают варианты, содержащие аминокислотные

модификации M285I, R381S, H656A, D711A и S805A в полноразмерном MTSP-1, приведенном в SEQ ID NO: 1.

MTSP-1 сверхэкспрессируется или является высоко активным при раке простаты, молочной железы и колоректальном раке и, предполагается, что он играет роль в метастазировании рака молочной железы и простаты. MTSP-1 также экспрессируется в различных эпителиальных тканях с высоким уровнем активности и/или экспрессии в желудочно-кишечном тракте и простате человека. Известны и другие виды MTSP-1. Например, был идентифицирован мышинный гомолог MTSP-1 под названием эпитин. MTSP-1 содержит трансмембранный домен, два домена CUB, четыре повтора LDLR и домен сериновой протеазы (или домен пептидазы S1) между аминокислотными остатками 615–854 (представлены как SEQ ID NO: 2 и 7), который является высоко консервативным среди всех членов пептидаз семейства S1 сериновых протеаз, таких как, например, химотрипсин (SEQ ID NO: 14 и 15). MTSP-1 синтезируется в виде зимогена из 855 аминокислот и активируется до формы активного двухцепочечного фермента путем расщепления между Arg614 и Val615. Кроме того, одноцепочечный протеолитический домен сам по себе является каталитически активным и функциональным.

MTSP-1 принадлежит к пептидазам семейства S1 сериновых протеаз (также называемого семейством химотрипсина), которое также включает химотрипсин и трипсин. Как правило, члены семейства химотрипсина имеют общую и структурную гомологию с химотрипсином. Последовательность MTSP-1 в настоящем документе имеет нумерацию аминокислотных остатков, которая приведена в соответствие с нумерацией аминокислотных остатков зрелого химотрипсина посредством выравнивания протеазного домена MTSP-1 с протеазным доменом химотрипсина. Основываясь на химотрипсиновой нумерации, остатки активного сайта представляют собой Asp102, His57 и Ser195. Линейная аминокислотная последовательность может быть выровнена с последовательностью химотрипсина и соответствующим образом пронумерована по β – листам химотрипсина. Вставки и удаления происходят в петлях между бета – листами, но во всем структурном семействе основа листов является консервативной. Сериновые протеазы взаимодействуют с субстратом через консервативные бета-листы. Между субстратом и ферментом может образовываться до 6 консервативных водородных связей. Все сериновые протеазы семейства химотрипсина имеют на своем N-конце протеазного домена консервативный участок, необходимый для каталитической активности (т.е. IGG, VVGG или IVGG, где первая аминокислота в этом квартете пронумерована в соответствии с химотрипсиновой нумерацией и обозначена как Ile16. Эта нумерация не отражает длину последовательности предшественника).

Субстратную специфичность MTSP-1 в протеазном домене картировали с использованием синтетической комбинаторной библиотеки позиционного сканирования и фагового дисплея субстрата [25]. Расщепляемые остатки в субстрате, которые распознаются MTSP-1, содержат Arg/Lys в P4 и основные остатки или Gln в P3, небольшие остатки в P2, Arg или Lys в P1 и Ala в P1'. Эффективные субстраты содержат Lys-Arg-Ser-Arg в сайтах P4-P1, соответственно. В большинстве случаев, субстратная специфичность в отношении MTSP-1 выявляет тенденцию, согласно которой, если P3 является основным, тогда P4, как правило, является неосновным; и если P4 является основным, то P3 имеет тенденцию быть неосновным. Известные субстраты для MTSP-1, включая, например, активируемый протеиназой рецептор-2 (PAR-2), активатор плазминогена урокиназного типа (uPA) и фактор роста гепатоцитов (HGF), соответствуют последовательности расщепления для MTSP-1 – специфичных субстратов.

MTSP-1 может расщеплять выбранные синтетические субстраты так же эффективно, как и трипсин, но проявляет более ограниченную специфичность к субстратам, чем трипсин. Каталитический домен MTSP-1 имеет общую для (химо)трипсиноподобных сериновых протеаз структуру фолда, но проявляет уникальные свойства, такие как гидрофобные/кислотные подсайты S2/S4 и открытая петля 60. Аналогичным образом, MTSP-1 не расщепляет беспорядочно пептидные субстраты по доступным остаткам Lys или Arg, но требует распознавания дополнительных остатков, окружающих расщепляемую пептидную связь. Это необходимое условие для первичной последовательности подчеркивает специфичность MTSP-1 для его субстратов. Например, хотя MTSP-1 расщепляет активированный протеиназой рецептор-2 (PAR-2) (целевая последовательность Ser-Lys-Gly-Arg в сайтах P4-P1 соответственно), фермент не активирует белки, тесно связанные с этим субстратом, такие как PAR-1, PAR-3 и PAR-4, которые не имеют возле расщепляемой связи целевых последовательностей, соответствующих повышенной специфичности MTSP-1 [35].

Протеазный домен MTSP-1 (см., например, SEQ ID NO: 2, 4) состоит из про-области и каталитического домена. Каталитически активная часть полипептида начинается после сайта аутоактивации в аминокислотном остатке 611 зрелого белка (см., например, SEQ ID NO: 1, 3 на RQAR, которые следуют за остатками VVGG). S1-карман MTSP-1 и S1-карман трипсина схожи между собой с хорошей комплементарностью как для Lys, так и для Arg в положении P1, что объясняет некоторые сходства в расщеплении субстрата трипсином. Размещение остатков P1-Lys обеспечивается Ser190, боковая цепь которого обеспечивает дополнительный акцептор водородной связи для стабилизации погруженной группы аммония [35]. Карман S2 имеет определенную форму для размещения небольших и средних

по размеру гидрофобных боковых цепей аминокислот в P2 и обычно принимает широкий диапазон аминокислот в положении P2. При связывании субстрата субсайт S2 не является жестким, о чем свидетельствует вращение бензильной группы Phe99. Ассоциация аминокислот субстрата в положениях P3 (для остатков Gln или основных) и P4 (для остатков Arg или Lys), по-видимому, обусловлена электростатическими взаимодействиями в карманах S3 и S4 с боковыми цепями аминокислот Asp-217 и/или Asp-96, которое может благоприятно переориентировать специфические основные белковые субстраты по мере их приближения к щели активного сайта фермента. Боковая цепь остатка P3 также способна образовывать водородную связь с карбоксамидной группой Gln192 или, альтернативно, боковая цепь P3 может проходить в субсайте S4 с образованием водородной связи с Phe97, тем самым ослабляя водородные связи с Gly216 между основными цепями. В любой конформации основная боковая цепь P3 способна благоприятно взаимодействовать с отрицательным потенциалом S4 кармана MTSP-1. Взаимная компенсация заряда и исключение из того же сайта S4 объясняют низкую вероятность одновременного появления остатков Arg/Lys в P3 и P4 в хороших субстратах MTSP-1. Как правило, аминокислотные положения MTSP-1 (основанные на химотрипсиновой нумерации), которые способствуют расширенной специфичности связывания субстрата, включают: 146 и 151 (S1'); 189, 190, 191, 192, 216, 226 (S1); 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 99 (S2); 192, 217, 218, 146 (S3); 96, 97, 98, 99, 100, 168, 169, 170, 170A, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 178, 179, 180, 215, 217, 224 (S4). Таблица 4 суммирует остатки в MTSP-1 для некоторых положений аминокислот, важных для специфических взаимодействий с целевым субстратом. Как правило, модификация протеазы MTSP-1 для изменения любой одной или нескольких аминокислот в кармане расширенной специфичности связывания или других вторичных сайтах взаимодействия влияет на специфичность или селективность протеазы для целевого субстрата.

Таблица 4. Структурные детерминанты расщепления субстрата MTSP-1 (химотрипсиновая нумерация).

Аминокислотные остатки, которые определяют специфичность													
S4					S3		S2			S1			
171	174	180	215	Cys168 Cys182	192	218	99	57	60 петля (58–64)	189	190	226	Cys191 Cys220
Leu	Gln	Met	Trp	13*	Gln	Asp	Phe	His	16*	Asp	Ser	Gly	да

* количество остатков в структурном элементе

3. Функция/Активность

Сериновая протеаза 1 мембранного типа (MTSP-1) представляет собой сериновую протеазу, обычно экспрессируемую в эпителиальных тканях, включая кожу, а также в эпителии почек, легких, предстательной железы и молочных желез [24, 38, 39] и экспрессируемую в различных типах опухолей [39]. MTSP-1 необходима для постнатального выживания. Так, мыши с дефицитом MTSP-1 развивались до срока, но вскоре после этого умирали и отличались aberrантным развитием кожи, что указывает на роль MTSP-1 в функции эпителиального и эпидермального барьера, что также важно для нормального развития кожи и волос [40]. Постнатальная абляция MTSP-1 вызывала у мутантных животных потерю образования плотного соединения и неправильно локализованных белков, ассоциированных с плотным соединением [41], что указывает на необходимость MTSP-1 для поддержания эпителия мыши. Сообщается также, что MTSP-1 стимулирует миграцию нервных клеток-предшественников [42].

MTSP-1 высоко экспрессируется или активна при раке простаты, молочной железы, легких, яичников и колоректального рака и может играть роль в метастазировании рака молочной железы и простаты. MTSP-1 также может быть идентифицирована в кровеносных сосудах, связанных с опухолями.

MTSP-1 также экспрессируется в различных эпителиальных тканях, с высоким уровнем активности и/или экспрессии в желудочно-кишечном тракте человека и простате. Присутствие MTSP-1 на поверхности опухоли или эпителиальных клеток позволяет взаимодействовать с различными факторами и протеолитически переваривать широкий спектр субстратов.

Роль MTSP-1 в миграции клеток на активность опухоли может вызывать изменения во внеклеточной среде и окружающих клетках, способствующих миграции, прогрессированию и метастазированию клеток. Из-за роли MTSP-1 в сосудистых заболеваниях и раке, полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, изменены таким образом, что они проявляют пониженную селективность по отношению к этим белкам.

В. ИНГИБИРОВАНИЕ КОМПЛЕМЕНТА ПОСРЕДСТВОМ НАЦЕЛИВАНИЯ НА C3

Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, проявляют повышенную специфичность и/или активность в отношении ингибирующего расщепления последовательности в белке C3 комплемента по сравнению с полипептидами MTSP-1, не содержащими аминокислотные модификации (например, человеческий MTSP-1 дикого типа (см. SEQ ID NO: 1) или эталонный полноразмерный MTSP-1 человека (см. SEQ ID NO: 3) или его каталитический домен или протеазный домен (см. SEQ ID NO: 2 или 4)). Эталонные полипептиды MTSP-1 включают замену C122S по химотрипсиновой

нумерации. Замена на S в остатке 122 не изменяет специфичность или активность в отношении C3, но уменьшает агрегацию. Поскольку C3 участвует в 3-х путях инициации комплемента (см., например, рис. 1), нацеливание на C3 (таргетинг C3) посредством протеолитического ингибирования обеспечивает общую и широкую терапевтическую мишень для инактивации каскада комплемента. Инактивационное расщепление C3 блокирует терминальную активность комплемента, а также петлю амплификации альтернативного пути. Все три пути сходятся в C3 (см., например, рисунок 1). Благодаря способности ингибировать активацию комплемента такие модифицированные полипептиды MTSP-1 можно использовать для лечения различных заболеваний, состояний и патологий, связанных с активацией комплемента, таких как воспалительные реакции и аутоиммунные заболевания. Активация комплемента связана с развитием заболеваний и состояний, за счет стимуляции локального (местного) воспаления и повреждения тканей, вызванного, в частности, образованием эффекторных молекул и мембраноатакующего комплекса. Так, например, при многих аутоиммунных заболеваниях комплемент вызывает повреждение ткани, поскольку он активируется при неподходящих обстоятельствах, например, антителом к тканям хозяина. В других ситуациях комплемент может активироваться нормально, например, при сепсисе, но все же способствует прогрессированию заболевания, например, при респираторном дистресс-синдроме. Патологически комплемент может привести к значительному повреждению кровеносных сосудов (васкулиту), базальной мембраны почки и прикрепленных эндотелиальных и эпителиальных клеток (нефриту), синовиального сустава (артриту) и эритроцитов (гемолизу), если не контролируется должным образом. Роль C3 в активации комплемента обсуждается более подробно ниже.

Модифицированные полипептиды MTSP-1 могут расщеплять C3. Например, однократная внутривенная инъекция вариантов анти-C3 MTSP-1 может удалить C3 из плазмы *in vivo*; и аналогично, одна интравитреальная инъекция может расщепить весь C3, присутствующий в стекловидном теле. Поскольку C3 является первым компонентом общего пути комплемента, который требуется для активации комплемента через все три пути «инициации» (классический, альтернативный и лектиновый), то инактивация/элиминация C3 функционально важна для всех трех путей комплемента.

1. Белок C3 комплемента и его роль в инициации комплемента

Система комплемента включает более 30 растворимых и связанных с клеточной мембраной белков, которые функционируют не только в опосредованном антителами иммунном ответе, но также во врожденном иммунном ответе для распознавания и уничтожения патогенных микроорганизмов, таких как бактерии, инфицированные вирусом

клетки и паразиты. Активация комплемента инициируется на поверхностях патогена тремя различными путями: классическим путем, альтернативным путем и лектиновым путем. Все 3 пути отличаются компонентами, необходимыми для их инициации, но в конечном счете, генерируют один и тот же набор эффекторных молекул (например, C3-конвертазы), которые расщепляют белок C3 комплемента, вызывая образование мембраноатакующего комплекса (МАК) (см., например, рисунок 1).

Таким образом, белок C3 комплемента является привлекательной мишенью для терапии, поскольку модуляция C3 приводит к модуляции различных опсонинов, анафилатоксинов и МАК.

Кроме того, встречающиеся в природе белки-ингибиторы комплемента, включая фактор H (FH), CR1, рецептор комплемента Ig (CR1g), DAF и MCP, ингибируют на уровне C3.

Существует три (3) пути активации комплемента (см. рисунок 1, на котором изображены эти пути). Пути комплемента различны; каждый полагается на разные молекулы и механизмы для инициации. Пути похожи в том, что они сходятся, чтобы генерировать один и тот же набор эффекторных молекул, то есть C3-конвертаз. В классическом и лектиновом путях C4b2b действует как C3-конвертаза; в альтернативном пути C3bBb представляет собой C3-конвертазу (см. Таблица 5). При расщеплении C3 образуется C3b, который действует как опсонин и как основная эффекторная молекула системы комплемента для последующих реакций комплемента, и C3a, который является пептидным медиатором воспаления. Добавление C3b к каждой C3-конвертазе образует C5-конвертазу, которая генерирует C5a и C5b. C5a, как и C3a, является пептидным медиатором воспаления. C5b опосредует «поздние» события активации комплемента, инициирующие последовательность реакций, кульминацией которых является образование мембраноатакующего комплекса (МАК). Хотя три пути производят разные C3- и C5-конвертазы, все пути производят продукты расщепления C3 и C5 и образуют МАК. Альтернативно, C3 может расщепляться и активироваться внешними протеазами, такими как лизосомальные ферменты и эластаза [43 – 44].

Таблица 5. Каскад комплемента.

	Альтернативный путь	Классический путь	Лектиновый путь
Активаторы	Поверхностные молекулы патогена ЛПС, тейхоевая кислота, зимозан	Антиген-связанные IgM и IgG; неиммунные молекулы	Патогены, через распознавание углеводов на поверхности
C3-конвертаза	C3bBb	C4b2b	C4b2b

C5–конвертаза	C3bBb3b	C4b2b3b	C4b2b3b
МАК	C5678poly9	C5678poly9	C5678poly9
Анафилатоксины	C3a, C5a	C3a, C4a, C5a	C3a, C4a, C5a

а. Классический Путь

C1q является первым компонентом классического пути комплемента. C1q является кальций–зависимым связывающим белком, связанным с семейством белков коллектина благодаря общей структурной гомологии [45 – 46].

Коллектины, часто называемые молекулами распознавания образов, обычно функционируют в качестве опсонинов, нацеливая патогены для фагоцитоза иммунными клетками. В отличие от обычных коллектинов, таких как MBL, карбокси–концевой глобулярный домен распознавания C1q не обладает активностью лектина, но может служить «заряженной» молекулой распознавания образов из–за заметных различий в электростатическом поверхностном потенциале его глобулярных доменов [47].

C1q инициирует классический путь комплемента двумя различными способами.

Во–первых, классический путь активируется взаимодействием C1q с иммунными комплексами (то есть комплексами антиген–антитело или агрегированным антителом IgG или IgM), таким образом связывая опосредованный антителами гуморальный иммунный ответ с активацией комплемента. Когда Fab–часть (вариабельная область) IgM или IgG связывает антиген, конформация Fc (константной) области изменяется, что позволяет C1q связываться. C1q должен связать как минимум 2 области Fc, чтобы быть активированным. C1q, однако, также способен активировать комплемент в отсутствие антител, тем самым функционируя при врожденном или немедленном иммунном ответе на инфекцию. Помимо инициации антителом, активация комплемента также достигается взаимодействием C1q с неиммунными молекулами, такими как полианионы (бактериальные липополисахариды, ДНК и РНК), некоторые небольшие полисахариды, вирусные мембраны, С–реактивный белок (CRP), сывороточный амилоидный Р–компонент (SAP) и бактериальные, грибковые и вирусные мембранные компоненты.

C1q является частью комплекса C1, который содержит одну молекулу C1q, связанную с двумя молекулами, каждая из которых представляет собой зимогены C1r и C1s. Связывание более чем одного из глобулярных доменов C1q с поверхностью–мишенью (такой как агрегированное антитело или патоген) вызывает конформационное изменение в комплексе (C1r: C1s) 2, которое приводит к активации протеазы C1r для расщепления C1s, чтобы образовать активную сериновую протеазу. Активные C1s расщепляют последующие компоненты C4 и C2 комплемента с образованием C4b и C2b, которые вместе образуют C3–конвертазу классического пути. C3–конвертаза расщепляет C3 до C3b, который ковалентно

прикрепляется к поверхности патогена и действует как опсонин, и C3a, который стимулирует воспаление. Некоторые молекулы C3b ассоциируются с комплексами C4b2b с образованием C4b2b3b, который является классической каскадной C5-конвертазой. В таблице 6 приведены белки, участвующие в классическом пути комплемента.

Таблица 6. Белки, участвующие в классическом пути комплемента.

Нативный компонент	Активная форма	Функция активной формы
C1 (C1q:(C1r:C1s) ₂)	C1q	Связывается непосредственно с поверхностями патогенов или косвенно с антителами, связанными с патогенами
	C1r	Расщепляет C1s до активной протеазы
	C1s	Расщепляет C4 и C2
C4	C4b	Связывается с патогеном и действует как опсонин; связывает C2 для его расщепления C1s протеазой
	C4a	Пептидный медиатор воспаления
C2	C2b	Активный фермент классического пути C3/C5-конвертазы; расщепляет C3 и C5
	C2a	Предшественник вазоактивного C2 кинина
C3	C3b	Связывается с поверхностями патогена и действует как опсонин; инициирует амплификацию через альтернативный путь; связывает C5 для расщепления C2b
	C3a	Пептидный медиатор воспаления

6. Альтернативный путь

Альтернативный путь инициируется чужеродными патогенами в отсутствие антител. Инициирование комплемента альтернативным путем происходит посредством самопроизвольного гидролиза C3 в C3b. Небольшое количество C3b всегда присутствует в жидкостях организма благодаря активности сывороточной и тканевой протеазы. Клетки хозяина обычно содержат высокие уровни мембранной сиаловой кислоты, которая инактивирует C3b, если он связывается, но бактерии содержат низкие уровни внешней сиаловой кислоты и, таким образом, связывают C3b, не инактивируя его. C3b на поверхностях патогена распознается протеазой Фактором В, находящейся в форме зимогена. Фактор В расщепляется фактором D. Фактор D является единственной активирующей протеазой системы комплемента, которая циркулирует как активный фермент, а не как зимоген, но поскольку фактор В является единственным субстратом для фактора D, то наличие низких уровней активной протеазы в нормальной сыворотке, как правило, безопасно для хозяина. Расщепление фактора В фактором D дает активный

продукт Bb, который может ассоциироваться с C3b с образованием C3bBb, C3-конвертазы альтернативного пути. Подобно классическому пути, C3-конвертаза производит больше C3b и C3a из C3. C3b ковалентно прикрепляется к поверхности патогена и действует как опсонин и дополнительно инициирует альтернативный путь, в то время как C3a стимулирует воспаление. Некоторые C3b присоединяются к комплексу с образованием C3bBb3b, C5-конвертазы альтернативного пути. C3bBb3b стабилизируется пропердином белка плазмы или фактором P, который связывается с микробными поверхностями и стабилизирует конвертазу. В таблице 7 приведены белки, участвующие в альтернативном пути комплемента.

Таблица 7. Белки, участвующие в альтернативном пути комплемента.

Нативный компонент	Активная форма	Функция активной формы
C3	C3b	Связывается с поверхностью патогена, связывает Фактор В для расщепления Фактором D
Фактор В	Ba	Маленький фрагмент Фактора В, неизвестная функция
	Bb	Активный фермент C3- и C5-конвертазы
Фактор D	D	Сериновая протеаза плазмы, расщепляет фактор В, когда он связан с C3b, с Ba и Bb
Фактор Р (пропердин)	P	Белки плазмы со сродством к C3bBb-конвертазе на бактериальных клетках; стабилизирует конвертазу

в. Лектиновый путь

Лектиновый путь (также называемый путем MBL) инициируется после распознавания и связывания патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (РАМР или ПАМР; т.е. углеводных фрагментов) белками лектина. Примеры лектиновых белков, которые активируют лектиновый путь комплемента, включают в себя связывающий маннозу лектин (MBL, mannose-binding lectin) и фиколины (то есть L-фиколин, М-фиколин и Н-фиколин). MBL является членом семейства белков-коллектинов и, следовательно, существует в виде олигомера субъединиц, состоящих из идентичных полипептидных цепей, каждая из которых содержит богатый цистеином домен, коллаген-подобный домен, домен «шей» шейный и углеводно-распознающий или лектиновый домен. MBL действует как молекула распознавания образов для распознавания углеводных фрагментов, в частности нейтральных сахаров, таких как манноза или N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), на поверхности патогенов через глобулярный лектиновый домен кальций-зависимым образом. MBL также действует как опсонин, способствуя

фагоцитозу бактериальных, вирусных и грибковых патогенов фагоцитарными клетками. Дополнительные инициаторы лектинового пути включают фиколины, в том числе L–фиколин, M–фиколин и H–фиколин [48]. Подобно MBL, фиколины распознают углеводные фрагменты, такие как, например, структуры N–ацетилглюкозамина и маннозы.

Активация альтернативного пути с помощью MBL или фиколинов аналогична активации классического пути с помощью C1q, при котором одна молекула лектина взаимодействует с двумя протеазными зимогенами. В случае лектиновых белков зимогены представляют собой связанные с MBL сериновые протеазы, MASP–1 и MASP–2, которые близко гомологичны зимогенам C1r и C1s классического пути. При распознавании PAMP белком лектина, например, путем связывания с поверхностью патогена, MASP–1 и MASP–2 активируются для расщепления C4 и C2 с образованием MBL каскада C3–конвертазы. Затем C3b присоединяется к комплексу с образованием MBL каскада C5–конвертазы. Активация MASP участвует не только в ответах на микроорганизмы, но и в любом ответе, который включает воздействие нейтральными сахарами, включая, но не ограничиваясь ими, повреждение тканей, такое как наблюдаемое при пересадке органов. Как и альтернативный каскад, MBL каскад активируется независимо от антитела; подобно классическому каскаду, в каскаде MBL используются C4 и C2 для образования C3–конвертазы. В таблице 8 приведены белки, участвующие в лектиновом пути комплемента.

Таблица 8. Белки, участвующие в лектиновом пути комплемента.

Нативный компонент	Активная форма	Функция активной формы
Связывающий маннозу лектин (MBL)	MBL	Распознает PAMP, например, на поверхности патогена (например, посредством распознавания углеводов)
Фиколины	L–фиколин, M–фиколин или H–фиколин	Распознает PAMP, например, на поверхности патогена (например, посредством распознавания углеводов)
MASP–1	MASP–1	Расщепляет C4 и C2
MASP–2	MASP–2	Расщепляет C4 и C2

г. Опосредованные комплементом эффекторные функции

Независимо от того, какой путь инициации используется, конечным результатом является образование активированных фрагментов белков комплемента (например, C3a, C4a и C5a анафилатоксины и C5b–9 мембраноатакующие комплексы), которые действуют как эффекторные молекулы для обеспечения различных эффекторных функций. Распознавание эффекторных молекул комплемента клетками для инициирования эффекторных функций (например, хемотаксиса и опсонизации) обеспечивается

разнообразной группой рецепторов комплемента. Рецепторы комплемента распределены по широкому кругу типов клеток, включая эритроциты, макрофаги, В-клетки, нейтрофилы и тучные клетки. При связывании компонента комплемента с рецептором, рецепторы инициируют внутриклеточный сигнальный каскад, что приводит к клеточным реакциям, таким как стимуляция фагоцитоза бактерий и выделение воспалительных молекул из клетки. Например, рецепторы комплемента CR1 и CR2, которые распознают C3b, C4b и их продукты, важны для стимуляции хемотаксиса. CR3 (CD11b/CD18) и CR4 (CD11c/CD18) являются интегринами, которые также важны в фагоцитарных ответах, но также играют роль в адгезии и миграции лейкоцитов в ответ на iC3b. Рецепторы C5a и C3a представляют собой рецепторы, связанные с G-белком, которые играют роль во многих провоспалительно-опосредованных функциях анафилатоксинов C5a и C3a. Например, рецепторы для C3a, C3aR существуют на тучных клетках, эозинофилах, нейтрофилах, базофилах и моноцитах и непосредственно участвуют в провоспалительных эффектах C3a.

Таким образом, через рецепторы комплемента эти фрагменты эффекторной молекулы комплемента обеспечивают несколько функций, включая хемотаксис лейкоцитов, активацию макрофагов, проницаемость сосудов и клеточный лизис [3]. Краткий перечень некоторых эффекторных функций продуктов комплемента приведен в таблице 9.

Таблица 9. Эффекторные молекулы и функции комплемента

Продукт	Активность
C2b (прокинин)	накопление жидкости организма
C3a (анафилатоксин)	дегрануляция базофилов и тучных клеток; повышение проницаемости сосудов; сокращение гладких мышц; индукция супрессорных Т-клеток
C3b и его продукты	опсонизация; активация фагоцитов
C4a (анафилатоксин)	активация базофилов и тучных клеток; сокращение гладких мышц; повышение проницаемости сосудов
C4b	опсонизация
C5a (анафилатоксин; хемотаксический фактор)	активация базофилов и тучных клеток; повышение проницаемости сосудов; сокращение гладких мышц; хемотаксис; агрегация нейтрофилов; стимуляция окислительного обмена; стимуляция высвобождения лейкотриена; индукция Т-хелперных клеток
C5b67	хемотаксис; прикрепление к другим клеточным мембранам и лизис клеток-наблюдателей
C5b6789 (C5b-9)	лизис клеток-мишеней

і. Опосредованный комплементом лизис: мембрано-атакующий комплекс

Последним этапом каскада комплемента по всем трем путям является формирование мембраноатакующего комплекса (МАК) (рис. 1). C5 может быть расщеплен любой C5-конвертазой на C5a и C5b. C5b соединяется с C6 и C7 в растворе, а комплекс C5b67 связывается с липидной мембраной патогена через гидрофобные участки на C7. C8 и несколько молекул C9, которые также имеют гидрофобные участки, соединяются, образуя мембраноатакующий комплекс, также называемый C5b6789 или C5b-9. C5b-9 образует в мембране пору, через которую могут проходить вода и растворенные вещества, что приводит к осмотическому лизису и гибели клеток. Если комплемент активируется на антигене без липидной мембраны, к которой может присоединиться C5b67, то комплекс C5b67 может связываться с соседними клетками и инициировать лизис наблюдателя. Один МАК может лизировать эритроцит, но ядросодержащие клетки могут эндоцитозировать МАК и восстанавливать повреждение, если не присутствует несколько МАК. Грамотрицательные бактерии с их внешней оболочкой и вирусы, как правило, восприимчивы к опосредованному комплементом лизису. Менее восприимчивыми являются грамположительные бактерии, плазматическая мембрана которых защищена толстым слоем пептидогликана, бактерии со слоем капсулы или слизи вокруг их клеточной стенки или вирусы, не имеющие липидной оболочки. Аналогично, МАК может разрушаться белками, которые связываются с комплексом до образования поры в мембране, такими как стрептококковый ингибитор комплемента (SIC) и кластерин. Как правило, МАК помогает уничтожать грамотрицательные бактерии, а также клетки человека, демонстрирующие чужеродные антигены (инфицированные вирусом клетки, опухолевые клетки и т. д.), вызывая их лизис, а также может повредить оболочку вирусов, покрытых оболочкой.

ii. Воспаление

Воспаление – это процесс, при котором кровеносные сосуды расширяются и становятся более проницаемыми, что позволяет защитным клеткам организма и химическим веществам покинуть кровь и проникнуть в ткани. Активация комплемента приводит к образованию нескольких провоспалительных медиаторов, таких как C3a, C4a и C5a. Интактные анафилатоксины в сыворотке или плазме быстро превращаются в более стабильные, менее активные формы C3a-desArg, C4a-desArg или C5a-desArg карбоксипептидазой N. C3a, C4a и C5a и, в меньшей степени, их производные desArg, являются сильнодействующими биологически активными полипептидами, называемыми анафилатоксинами из-за их воспалительной активности. Анафилатоксины связываются с рецепторами различных типов клеток, чтобы стимулировать сокращение гладких мышц, увеличивать проницаемость сосудов и активировать тучные клетки для высвобождения

медиаторов воспаления. C5a, самый мощный анафилатоксин, в первую очередь действует на лейкоциты, особенно на нейтрофилы. C5a стимулирует прилипание лейкоцитов к стенкам кровеносных сосудов в месте инфекции, стимулируя повышенную экспрессию молекул адгезии, так что лейкоциты могут выдавливаются из кровеносных сосудов и в ткани, этот процесс называется диапедезом. C5a также стимулирует нейтрофилы для производства активных форм кислорода для внеклеточного уничтожения, протеолитических ферментов и лейкотриенов. C5a также может дополнительно усиливать воспалительный процесс косвенным путем, индуцируя выработку хемокинов, цитокинов и других провоспалительных медиаторов. C5a также взаимодействует с тучными клетками, высвобождая вазодилататоры, такие как гистамин, так что кровеносные сосуды становятся более проницаемыми. C3a также взаимодействует с лейкоцитами, что оказывает значительное влияние на эозинофилы, что указывает на роль C3a в аллергическом воспалении. C3a вызывает сокращение гладких мышц, улучшает проницаемость сосудов и вызывает дегрануляцию базофилов и высвобождение гистамина и других вазоактивных веществ. C2a может быть преобразован в C2 кинин, который регулирует кровяное давление, вызывая расширение кровеносных сосудов.

Хотя технически это соединение не считается анафилатоксином, iC3b – неактивное производное C3b, выполняет функцию индукции адгезии лейкоцитов к эндотелию сосудов и индуцирует выработку провоспалительного цитокина IL-1 посредством связывания с рецепторами интегрина на поверхности клетки. C5b-9 также косвенно стимулирует адгезию, активацию и хемотаксис лейкоцитов, индуцируя экспрессию молекул клеточной адгезии, таких как E-селектин, и индуцируя секрецию интерлейкина-8 [49]. C5b-9 также стимулирует высвобождение вторичных медиаторов, которые способствуют воспалению, таких как, например, простагландин E2, лейкотриен B4 и тромбоксан.

Преобразование компонентов C3 и C5 комплемента человека, с получением их соответствующих продуктов анафилатоксина, было вовлечено в некоторые встречающиеся в природе патологические состояния, включая: аутоиммунные нарушения, такие как системная красная волчанка, ревматоидный артрит, злокачественная опухоль, инфаркт миокарда, ретинопатия Пурчера, сепсис и респираторный дистресс-синдром у взрослых. Кроме того, повышенные уровни C3a и C5a в кровотоке были обнаружены в определенных условиях, связанных с активацией ятрогенного комплемента, таких как: операция сердечно-легочного шунтирования, т.е. операция с применением аппарата искусственного кровообращения, почечный диализ и лейкофорез нейлоновых волокон.

iii. Хемотаксис

Хемотаксис – это процесс, посредством которого клетки направляются на миграцию в ответ на химические вещества в окружающей среде. При иммунном ответе различные хемокины направляют движение клеток, таких как фагоцитарные клетки, к участкам инфекции. Например, C5a является основным хемотаксическим фактором для циркулирующих нейтрофилов, но также может индуцировать хемотаксис моноцитов. Фагоциты будут двигаться в направлении увеличения концентрации C5a и впоследствии присоединяться через свои рецепторы CR1 к молекулам C3b, связанным с антигеном. Хемотаксический эффект C5a, наблюдаемый у базофилов, эозинофилов, нейтрофилов и мононуклеарных фагоцитов, активен при концентрациях всего 10^{-10} М.

iv. Опсонизация

Важным действием комплемента является облегчение поглощения и уничтожения патогенов фагоцитарными клетками. Это происходит в процессе опсонизации, при котором компоненты комплемента, связанные с бактериями–мишенями, взаимодействуют с рецепторами комплемента на поверхности фагоцитирующих клеток, таких как нейтрофилы или макрофаги. В этом случае эффекторные молекулы комплемента называются опсонинами. Опсонизация патогенов является основной функцией C3b и C4b. iC3b также функционирует как опсонин.

C3a и C5a увеличивают экспрессию рецепторов C3b на фагоцитах и повышают их метаболическую активность.

C3b и, в меньшей степени, C4b помогают удалять вредные иммунные комплексы из организма. C3b и C4b присоединяют иммунные комплексы к рецепторам CR1 на эритроцитах. Затем эритроциты доставляют комплексы в фиксированные макрофаги в селезенке и печени для разрушения. Иммунные комплексы могут привести к вредоносной гиперчувствительности III типа.

v. Активация гуморального иммунного ответа

Активация В–клеток требует лигирования В–клеточного рецептора (BCR) антигеном. Однако было показано, что комплемент играет роль в снижении порога ответа В–клеток на антиген до 1000 раз. Это происходит путем связывания C3d или C3dg, продуктов комплемента, генерируемых из фрагментов расщепления C3, с рецепторами CR2 на В–лимфоцитах, которые могут связываться с BCR. Ко–лигирование происходит, когда антигенные частицы, такие как, например, иммунные комплексы, опсонизированные C3d, связывают рецептор CR2 через C3d, а также BCR через антиген. Ко–лигирование антигенных комплексов также может происходить, когда C3d связывается с антигенами, усиливая их поглощение антигенпрезентирующими клетками, такими как дендритные клетки, которые затем могут презентировать антиген В–клеткам для усиления ответа

антител. У мышей с дефицитом CR2 обнаруживаются дефекты функции В-клеток, которые приводят к снижению уровня природных антител и нарушению гуморального иммунного ответа.

2. Структура и функции C3

Представленные здесь варианты полипептидов MTSP-1 расщепляют белок C3 комплемента или его протеолитические фрагменты, тем самым ингибируя комплемент. Белок C3 комплемента человека (инвентарный номер Uniprot P01024) представляет собой одноцепочечный пре-пропротеин из 1663 аминокислот, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9. Белок кодируется геном длиной 41 т.п.н., расположенным в хромосоме 19 (нуклеотидная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 10). Пре-пропротеин содержит сигнальный пептид из 22 аминокислот (аминокислоты 1–22 SEQ ID NO: 9) и тетрааргининовую последовательность (аминокислоты 668–671 SEQ ID NO: 9), которая удаляется фуриноподобным ферментом, что приводит к образованию зрелого двухцепочечного белка, содержащего бета-цепь (аминокислоты 23–667 SEQ ID NO: 9) и альфа-цепь (аминокислоты 672–1663 SEQ ID NO: 9), которые связаны межцепочечной дисульфидной связью между аминокислотными остатками Cys559 и Cys816. Зрелый 2-цепочечный белок имеет последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 16.

Во время каскада комплемента белок C3 комплемента дополнительно обрабатывается протеолитическим расщеплением с образованием различных протеолитических фрагментов C3. Как описано выше, все три пути инициации комплемента сходятся на конверсиях C3 C4b2b и C3bBb. C3 превращает расщепление C3 между остатками 748 и 749 SEQ ID NO: 9 (см. Таблицу 10 ниже), образуя анафилатоксин C3a (аминокислоты 672–748 из SEQ ID NO: 9) и опсонин C3b (альфа-цепь C3b; аминокислоты 749–1663 из SEQ ID NO: 9). C3a участвует в воспалении, а C3b образует C5-конвертазы, в конечном итоге приводящие к анафилатоксину C5a и МАК. Представленные здесь варианты полипептидов MTSP-1 ингибируют комплемент и, как таковые, не расщепляют C3 в сайте расщепления GLAR.

C3b имеет сайты связывания для различных компонентов комплемента, включая C5, пропердин (P), факторы H, B и I, рецептор комплемента 1 (CR1) и мембранный белок кофактора (MCP) [50]. Связывание фактора I, плазматической протеазы, в присутствии кофакторов H, CR1 и MCP приводит к инактивации C3b, тогда как связывание факторов B и P в присутствии фактора D приводит к амплификации C3-конвертазы и инициации МАК. Фактор I расщепляет C3b в присутствии кофакторов между остатками 1303–1304, 1320–1321 и 954–955 SEQ ID NO: 9 (см. Таблицу 10 ниже), образуя фрагменты iC3b

(аминокислоты 749–1303 из SEQ ID NO: 9) и C3f (аминокислоты 1304–1320 из SEQ ID NO: 9). Впоследствии фактор I расщепляет iC3b, образуя C3c (фрагмент 1 альфа'-цепи C3c; аминокислоты 749–954 из SEQ ID NO: 9) и C3dg (аминокислоты 955–1303 из SEQ ID NO: 9). Конечным результатом является то, что C3b постоянно инактивируется [50]. Поскольку фактор I инактивирует C3b, сайты расщепления фактора I являются идеальными кандидатами для расщепления различными полипептидами MTSP-1, представленными в настоящем документе. Дополнительные протеолитические фрагменты C3b включают C3g (аминокислоты 955–1001 из SEQ ID NO: 9), C3d (аминокислоты 1002–1303 из SEQ ID NO: 9) и фрагмент 2 альфа'-цепи C3c (аминокислоты 1321–1663 из SEQ ID NO: 9). Последовательности расщепления в комплементарном белке C3 приведены в Таблице 10 ниже, в которой перечислены остатки P4–P1, аминокислотные остатки сайта расщепления (сайт P1–P1') и протеаза, ответственная за расщепление. Раскрытые в данном документе модифицированные полипептиды MTSP-1 не расщепляются в этих сайтах.

Таблица 10. Последовательности расщепления белка C3 комплемента.

P4–P1 Остатки	Сайты расщепления (в SEQ ID NO:9)	Протеаза	SEQ ID NO
GLAR	748–749	C3–конвертаза	17
RLGR	954–955	Фактор I	18
LPSR	1303–1304	Фактор I	19
SLLR	1320–1321	Фактор I	20

а. C3а

C3а (аминокислоты 672–748 SEQ ID NO: 9) представляет собой анафилатоксин, который участвует в воспалении, дегрануляции базофилов и тучных клеток, повышенной проницаемости сосудов, сокращении гладких мышц и индукции Т-клеток–супрессоров.

б. C3b

C3b (аминокислоты 749–1663 из SEQ ID NO: 9) играет различные роли в каскаде комплемента. C3b является опсонином, который облегчает поглощение и разрушение патогенов фагоцитарными клетками. Кроме того, C3b объединяется с C3–конвертазами, чтобы генерировать C5–конвертазы, которые активируют белок C5 комплемента, тем самым генерируя C5а анафилатоксин и C5b, которые объединяются с C6, C7, C8 и C9, образуя мембраноатакующий комплекс. Кроме того, как описано выше, C3b участвует в

альтернативном пути инициации комплемента. C3b регулируется регуляторным белком комплемента Фактором I, протеазой плазмы, которая разлагает C3b на различные фрагменты, включая iC3b, C3c, C3d, C3f и C3dg, тем самым постоянно инактивируя C3b.

C3b играет критическую роль в опосредованных комплементом эффекторных функциях благодаря своей способности связываться с C3-конвертазами C4b2b и C3bBb, тем самым генерируя C5-конвертазы C4b2b3b и C3bBb3b. C5-конвертаза расщепляет зимоген C5 в его активные фрагменты, а именно C5a анафилатоксин и C5b. C5a участвует в хемотаксисе и воспалении, а C5b участвует в формировании МАК.

в. Ингибиторы C3b

C3b имеет сайты связывания для различных компонентов комплемента, включая C5, пропердин (P), Факторы H, B и I, рецептор комплемента 1 (CR1) и мембранный белок кофактора (MCP) [50]. Связывание Фактора I, плазматической протеазы, в присутствии кофакторов H, CR1 и MCP приводит к инактивации C3b, тогда как связывание Факторов B и P в присутствии Фактора D приводит к амплификации C3-конвертазы и инициации МАК. Фактор I расщепляет C3b в присутствии кофакторов между остатками 1303–1304, 1320–1321 и 954–955 SEQ ID NO: 9, генерирующих фрагменты iC3b (аминокислоты 749–1313 SEQ ID NO: 9) и C3f (аминокислоты 1304–1320 из SEQ ID NO: 9). Хотя технически он не считается анафилатоксином, iC3b, неактивное производное C3b, выполняет функцию индукции адгезии лейкоцитов к эндотелию сосудов и индуцирует выработку провоспалительного цитокина IL-1 посредством связывания с рецепторами интегрина на клеточной поверхности. Кроме того, iC3b действует как опсонин. Фактор I впоследствии расщепляет генерирующие iC3b фрагменты C3c (фрагмент 1 альфа'-цепи C3c: аминокислоты 749–954 SEQ ID NO: 9 и фрагмент 2 альфа'-цепи C3c: аминокислоты 1321–1663 из SEQ ID NO: 9) и C3dg (аминокислоты 955–1303 из SEQ ID NO: 9). Конечным результатом является то, что C3b постоянно инактивируется [50]. C3dg может быть дополнительно расщеплен для получения фрагментов C3g (аминокислоты 955–1001 из SEQ ID NO: 9) и C3d (аминокислоты 1002–1303 из SEQ ID NO: 9).

Г. МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ MTSP-1, РАСЩЕПЛЯЮЩИЕ C3

В данном документе представлены модифицированные или варианты полипептиды сериновой протеазы 1 (MTSP-1) мембранного типа. Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, проявляют измененные активности или свойства по сравнению с нативным или эталонным полипептидом MTSP-1 дикого типа. Например, полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, содержат модификации по сравнению с полипептидом MTSP-1 дикого типа, нативным или

эталонным, представленным в любой из SEQ ID NO: 1–4, или с полипептидом, который имеет по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, по меньшей мере 95%, идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 1–4, такой как эталонный протеазный домен MTSP–1, представленный в SEQ ID NO: 4. В число представленных в настоящем документе модифицированных полипептидов MTSP–1 входят полипептиды MTSP–1, которые изменяют (ингибируют) активацию комплемента путем осуществления ингибирующего расщепления белка C3 комплемента. В число представленных в настоящем документе модифицированных полипептидов MTSP–1 входят те, которые влияют на ингибирующее расщепление белка C3 комплемента. В число представленных в настоящем документе модифицированных полипептидов MTSP–1 входят те, которые влияют на ингибирующее расщепление C3 с большей активностью или специфичностью, k_{cat}/K_m , по сравнению с соответствующей формой MTSP–1, которая не содержит модификации (замены, делеции и/или вставки) или по сравнению с соответствующей формой немодифицированного MTSP–1, последовательности которого представлены в любой из SEQ ID NO: 1–4. Модифицированные полипептиды MTSP–1 также могут иметь пониженную специфичность и/или селективность в отношении субстратов и мишеней, расщепляемых или распознаваемых немодифицированным MTSP–1, по сравнению с полипептидом MTSP–1, не содержащим аминокислотную модификацию(и), таким как, например, активируемый протеиназой рецептор–2 (PAR–2), активатор плазминогена урокиназного типа (uPA) и/или фактор роста гепатоцитов (HGF).

Модифицированные полипептиды MTSP–1, раскрытые в данном документе, ингибируют или инактивируют комплемент посредством ингибирующего или инактивационного расщепления белка C3 комплемента. Модифицированные полипептиды MTSP–1, раскрытые в данном документе, ингибируют или инактивируют комплемент путем расщепления белка комплемента C3 в сайте расщепления, что приводит к ингибированию или инактивации C3. Инактивация или ингибирование расщепления белка комплемента C3 может происходить в любой последовательности в C3, если в результате расщепления C3 происходит инактивация или ингибирование активации комплемента. Поскольку модифицированные полипептиды MTSP–1, раскрытые в данном документе, ингибируют активацию комплемента, модифицированные полипептиды MTSP–1 не влияют на расщепление зимогенной формы C3 с образованием активированных фрагментов C3a и C3b. Таким образом, модифицированные полипептиды MTSP–1, раскрытые в данном документе, не расщепляют C3 между остатками 748–749 SEQ ID NO: 9, что привело бы к образованию C3a и C3b. Сайты ингибирования или инактивации белка

C3 комплемента могут быть определены или идентифицированы эмпирически. Если необходимо, модифицированный полипептид MTSP-1, представленный в настоящем документе, может быть протестирован на его способность ингибировать комплемент, как описано в разделе Д ниже и как показано в примерах.

Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, представляют собой изолированные протеазные домены MTSP-1. Также рассматриваются их меньшие части, которые сохраняют протеазную активность. Раскрытые в данном документе протеазные домены представляют собой одноцепочечные полипептиды с N-концом, генерируемым в сайте расщепления (обычно имеющие консенсусную последовательность R ↓ VVGG, R ↓ IVGG, R ↓ IVNG, R ↓ ILGG, R ↓ VGLL, R ↓ ILGG или его вариация: N-конец R ↓ V или R ↓ I, где стрелка представляет точку расщепления), когда зимоген активирован.

Однако генерируемые в настоящем документе протеазные домены не являются результатом активации, которая продуцирует двухцепочечный активированный продукт, а представляют собой одноцепочечные полипептиды с N-концом, включающие консенсусную последовательность ↓ VVGG, ↓ IVGG, ↓ VGLL, ↓ ILGG или ↓ IVNG или другой такой мотив на N-конце. Как показано в настоящем документе, такие полипептиды, хотя и не являются результатом активации и не являются двухцепочечными формами, проявляют протеолитическую (каталитическую) активность. Эти полипептиды домена протеазы используются в анализах для скрининга агентов, которые модулируют активность MT-SP. Такие анализы также предоставлены в настоящем документе. В иллюстративных анализах оценивают влияние тестируемых соединений на способность протеазных доменов протеолитически расщеплять известный субстрат, обычно флуоресцентно, хромогенно или иным образом детектируемый меченный субстрат. Агенты, обычно соединения, особенно небольшие молекулы, которые модулируют активность домена протеазы, являются кандидатами в соединения для модуляции активности MT-SP. Протеазные домены также можно использовать для получения одноцепочечных протеазо-специфичных антител. Протеазные домены любого члена семейства MT-SP, предпочтительно млекопитающего, включая человека и наиболее предпочтительно человека, такие как, например, MTSP-1, раскрытые в данном документе, включают, но не ограничиваются этим, одноцепочечную область, имеющую N-конец в сайте расщепления для активации зимогена через C-конец или его укороченные C-концевые части, которые проявляют протеолитическую активность как одноцепочечный полипептид в *in vitro* анализах протеолиза.

Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, представляют собой мутанты одноцепочечного протеазного домена MTSP-1, в частности

модифицированные полипептиды MTSP-1, в которых остаток Cys в протеазном домене является свободным (то есть не образует дисульфидные связи с какими-либо другими остатками Cys в белке), замещен другой аминокислотной заменой, предпочтительно консервативной аминокислотной заменой или заменой, которая не устраняет активность, такой как, например, замена серином, и модифицированными полипептидами MTSP-1, в которых сайт(ы) гликозилирования удаляется(ются). Также предлагаются модифицированные полипептиды MTSP-1 с другими консервативными аминокислотными заменами, в которых сохраняется каталитическая активность (см., например, таблицу 3, для примерных аминокислотных замен).

Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, катализируют ингибирующее или инактивационное расщепление белка C3 комплемента. Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, расщепляют белок C3 комплемента при любой последовательности расщепления, пока полученные фрагменты C3 неактивны или неспособны активировать опосредованную комплементом эффекторную функцию. Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, включают в себя полипептиды, которые изменили (то есть уменьшили) специфичность и/или селективность в отношении природных мишеней MTSP-1. В одном примере модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, обладают пониженной селективностью в отношении PAR-2, uPA и/или HGF. В других примерах модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, обладают повышенной специфичностью для расщепления белка C3 комплемента и сниженной специфичностью в отношении PAR-2, uPA и/или HGF.

Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, содержат одну или несколько модификаций аминокислот, так что они расщепляют белок C3 комплемента таким образом, который приводит к инактивации или ингибированию комплемента. Модификации могут представлять собой одну аминокислотную модификацию, такую как одиночные аминокислотные замены (замены), вставки или делеции, или множественные аминокислотные модификации, такие как множественные аминокислотные замены, вставки или делеции. Типичными модификациями являются аминокислотные замены, включая одиночные или множественные аминокислотные замены. Аминокислотная замена может быть консервативной заменой, такой как изложенная в Таблице 3, или неконсервативной заменой, такой как любая описанная в настоящем документе. Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, могут содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,

17, 18, 19, 20 или более модифицированных положений в последовательности по сравнению с полипептидом MTSP-1, не содержащим модификацию.

Описанные здесь модификации могут быть сделаны в любом полипептиде MTSP-1. Например, модификации сделаны в полипептиде MTSP-1 человека, имеющем последовательность аминокислот, включающую или изложенную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4; в полипептиде MTSP-1 мыши, имеющим последовательность аминокислот, включающую или изложенную в SEQ ID NO: 12; или в полипептиде MTSP-1 крысы, имеющим последовательность аминокислот, включающую или изложенную в SEQ ID NO: 13; или в вариантах последовательности или каталитически активных фрагментов, которые показывают по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% , 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 1-4, 12 и 13.

Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, могут быть модифицированы в любой области или домене полипептида MTSP-1, представленного в данном документе, при условии, что модифицированный полипептид MTSP-1 сохраняет свою способность влиять на инактивацию или ингибирующее расщепление белка C3 компонента. Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, могут быть одноцепочечными или двухцепочечными полипептидами, вариантами видов, вариантами сплайсинга, аллельными вариантами, изоформами или их каталитически активными фрагментами, такими как, например, их протеазный домен. Полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, могут быть полноразмерными или усеченными полипептидами MTSP-1. Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, могут представлять собой протеазный домен MTSP-1 или модифицированную форму протеазного домена MTSP-1. Для использования в настоящем изобретении также рассматриваются зимогенные, предшественники или зрелые формы модифицированных полипептидов MTSP-1, при условии, что полипептиды MTSP-1 сохраняют свою способность влиять на ингибирующее или инактивационное расщепление белка C3 компонента. Модификации в полипептиде MTSP-1 также могут быть внесены в полипептид MTSP-1, который также содержит другие модификации, включая модификации первичной последовательности и модификации, отсутствующие в первичной последовательности полипептида. Например, описанные здесь модификации могут быть в полипептиде MTSP-1, который представляет собой гибридный полипептид или химерный полипептид. Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, также включают полипептиды, которые конъюгированы с полимером, таким как реагент ПЭГ.

Для целей настоящего описания ссылка на положения и аминокислоты для модификации, включая аминокислотную замену или замены, в данном документе относится к полипептиду MTSP-1, указанному в любой из SEQ ID NO: 1–4. Специалист в данной области техники может осуществить любую из представленных здесь модификаций в другом полипептиде MTSP-1 путем идентификации соответствующего аминокислотного остатка в другом полипептиде MTSP-1, таком как полипептид MTSP-1, указанный в любой из SEQ ID NO: 1–4 или его вариант, который имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности полипептида MTSP-1, указанного в любом из SEQ ID NO: 1–4. Соответствующие положения в другом полипептиде MTSP-1 могут быть идентифицированы путем выравнивания полипептида MTSP-1 с эталонным полипептидом MTSP-1, представленным в любой из SEQ ID NO: 1–4. Для целей модификации (например, замены аминокислоты) соответствующий аминокислотный остаток может быть любым аминокислотным остатком и не обязательно должен быть идентичен остатку, указанному в любой из SEQ ID NO: 1–4. Как правило, соответствующий аминокислотный остаток, идентифицированный путем выравнивания, например, с остатками в SEQ ID NO: 4, представляет собой аминокислотный остаток, который идентичен SEQ ID NO: 4, или представляет собой консервативный или полуконсервативный аминокислотный остаток к нему. Также подразумевается, что приведенные в качестве примера замены, представленные в данном документе, могут быть сделаны в соответствующем остатке в полипептиде MTSP-1, таком как протеазный домен MTSP-1, при условии, что замена отличается от того, что существует в немодифицированной или эталонной форме полипептида MTSP-1, такой как протеазный домен MTSP-1. На основании этого описания и описания, приведенного в другом месте данного документа, специалист в данной области может создать модифицированный полипептид MTSP-1, содержащий любую одну или несколько описанных мутаций, и протестировать каждую из них на наличие свойства или активности, как указано в данном документе.

Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, изменяют активность комплемента путем протеолиз-опосредованного ингибирования или инактивации белка C3 комплемента. Модифицированный MTSP-1, представленный в настоящем документе, может иметь пониженную специфичность к субстрату MTSP-1, такому как, например, активируемый протеиназой рецептор-2 (PAR-2), активатор плазминогена урокиназного типа (uPA) и/или фактор роста гепатоцитов (HGF). Например, модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, демонстрируют менее 100% активности полипептида MTSP-1 дикого типа для

расщепления активируемого протеиназой рецептора-2 (PAR-2), активатора плазминогена типа урокиназы (uPA) и/или фактора роста гепатоцитов (HGF), такой как менее чем 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%) или менее активности полипептида MTSP-1 дикого типа или эталонного полипептида, такого как соответствующий полипептид, не содержащий модификаций аминокислотной последовательности, где указанная активность представляет собой активность расщепления активируемого протеиназой рецептора-2 (PAR-2), активатора плазминогена урокиназного типа (uPA) и/или фактора роста гепатоцитов (HGF). В другом примере модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, проявляют менее 100% активности связывания полипептида MTSP-1 дикого типа по отношению к PAR-2, uPA и/или HGF, например менее 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или менее активности для связывания с PAR-2, uPA и/или HGF полипептида MTSP-1 дикого типа или эталонного полипептида, такого как соответствующий полипептид, не содержащий модификаций аминокислотной последовательности.

В настоящем документе также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют любой из модифицированных полипептидов MTSP-1, представленных в настоящем документе. Также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют одноцепочечный протеазный домен или его каталитически активную часть. В некоторых примерах кодирующие молекулы нуклеиновой кислоты также можно модифицировать, чтобы они содержали гетерологичную сигнальную последовательность для изменения (например, повышения) экспрессии и секреции полипептида. Модифицированные полипептиды MTSP-1 и кодирующие молекулы нуклеиновой кислоты, раскрытые в данном документе, могут быть получены или изолированы или выделены любым способом, известным в данной области техники, включая изолирование или выделение из природных источников, изолирование или выделение рекомбинантно продуцируемых белков в клетках, тканях и организмах, а также изолирование или выделение рекомбинантными методами и способами, включая этапы *in silico*, синтетические методы и любые способы, известные специалистам в данной области техники. Модифицированные полипептиды и кодирующие молекулы нуклеиновой кислоты, раскрытые в данном документе, могут быть получены стандартными методами рекомбинантной ДНК, известными специалисту в данной области. Может быть использован любой способ, известный в данной области, для осуществления мутации любой одной или более из аминокислот в целевом белке. Методы включают стандартный сайт-направленный или случайный мутагенез кодирующих молекул нуклеиновых кислот или методы твердофазного синтеза полипептидов. Например, молекулы нуклеиновой

кислоты, кодирующие полипептид MTSP-1, могут быть подвергнуты мутагенезу, такому как случайный мутагенез кодирующей нуклеиновой кислоты, подверженная ошибкам ПЦР, сайт-направленный мутагенез, ПЦР с перекрытием, перетасовка генов или другие рекомбинантные методы. Затем нуклеиновая кислота, кодирующая полипептиды, может быть введена в клетку-хозяина для экспрессии гетерологично. Следовательно, в настоящем документе также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любой из модифицированных полипептидов, представленных в настоящем документе. В некоторых примерах модифицированные полипептиды MTSP-1 получают синтетически, например, с использованием твердофазного или жидкофазного синтеза пептидов.

Полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, были модифицированы для того, чтобы иметь повышенную специфичность и/или селективность расщепления ингибирующей или инактивационной последовательности расщепления белка C3 комплемента. Полипептиды MTSP-1 могут быть модифицированы с использованием любого известного в данной области способа модификации белков. Такие методы включают сайт-направленный и случайный мутагенез. Анализы, такие как анализы биологической функции активации комплемента, раскрытые в данном документе и известные в данной области, могут быть использованы для оценки биологической функции модифицированного полипептида MTSP-1, для определения того, предназначен ли конкретный модифицированный полипептид MTSP-1 для расщепления и инактивации белка C3 комплемента. В данном документе раскрыты иллюстративные способы идентификации полипептида MTSP-1 и модифицированных полипептидов MTSP-1.

1. Типичные модифицированные полипептиды MTSP-1.

В данном документе представлены модифицированные полипептиды MTSP-1, которые содержат еще одну и более модификаций, включая 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 и более модификаций аминокислот в полипептиде MTSP-1, который расщепляет белок C3 комплемента так, что происходит ингибирование или инактивация комплемента. Модификации находятся в первичной аминокислотной последовательности и включают замены, делеции и вставки аминокислотных остатков. Модификации изменяют специфичность/активность полипептида MTSP-1.

Модифицированные полипептиды MTSP-1, описанные в данном документе, предназначены или выбраны для распознавания и расщепления целевого сайта (сайта-мишени) в белке комплемента, в частности, в сайте C3, которое приводит к инактивации C3. Указанные полипептиды также могут быть дополнительно модифицированы и подвергнуты скринингу для снижения специфичности/активности в отношении природных субстратов *in vivo* и/или для расщепления таких субстратов в меньшей степени по

сравнению с таковым расщеплением немодифицированного полипептида MTSP-1 дикого типа. Они могут быть выбраны и идентифицированы любым подходящим методом скрининга протеаз. Модифицированные полипептиды MTSP-1 в данном документе первоначально были идентифицированы с использованием метода скрининга, описанного в патенте US № 8,211,428, в котором библиотека модифицированных протеаз реагирует с родственным или другим ингибирующим серпином, таким как АТIII, который модифицирован для включения целевой последовательности в петлю реактивного сайта для захвата модифицированных протеаз, которые будут расщеплять такую мишень.

Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, проявляют повышенную активность или специфичность или k_{cat}/K_m для белка C3 комплемента в сайте, который инактивирует C3, а также могут иметь пониженную активность или специфичность и/или демонстрировать повышенную селективность, специфичность и/или активность для сайта-мишени белка комплемента C3, посредством которого модифицированный полипептид MTSP-1 инактивирует C3. Модифицированные полипептиды MTSP-1 проявляют повышенную активность в отношении расщепления и инактивации C3 по сравнению с соответствующей формой дикого типа или дикого типа с заменой C122S (по химотрипсиновой нумерации). В частности, протеазный домен модифицированного полипептида проявляет повышенную активность инактивационного расщепления C3 по сравнению с протеазным доменом MTSP-1, представленным в SEQ ID NO: 4 (протеазный домен MTSP-1 с C122S). Увеличение активности может составлять 10%, 20%, 50%, 100% по сравнению с немодифицированным MTSP-1. Так же активность может быть увеличена в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и более раз по сравнению с немодифицированным MTSP-1.

Например, модифицированный полипептид MTSP-1 может проявлять 110–1000% или более активности полипептида MTSP-1 дикого типа или эталонного MTSP-1, такого как полипептид MTSP-1, представленный в любой из SEQ ID NO: 1–4, в отношении инактивации C3. Например, модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, демонстрируют 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% или более активности немодифицированного или эталонного полипептида MTSP-1, такого как соответствующий полипептид, не содержащий аминокислотную модификацию (например, аминокислотную замену), например, протеазный домен MTSP-1, представленный в любой из SEQ ID NO: 1–4. Например, примерные положения, которые могут быть изменены, например, замещением или заменой аминокислоты, включают, но не ограничиваются ими, любое из положений 637, 640, 658, 661, 664, 666, 705, 706, 707, 708, 731, 759, 783 или 801

последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 1 (указанные положения соответствуют положениям 38, 41, 59, 60b, 60e, 60g, 96, 97, ins97a, 98, 99, 122, 151, 175, 192 по химотрипсиновой нумерации). Например, положения аминокислот могут быть заменами в положениях, соответствующих замене глутамина (Q) в любом из положений 637, 1640, Y658, D661, F664, Y666, D705, F706, T707, F708, C731, G759, Q783 или C801 последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO: 1 (указанные положения соответствуют положениям Q38, 141, Y59, D60b, F60e, Y60g, D96, F97, T98, F99, C122, G151, Q175, C191 по химотрипсиновой нумерации).

Типичные аминокислотные замены в любом из указанных выше положений приведены в таблице 11. Ссылка на соответствующую позицию в таблице 11 относится к позициям, указанным в SEQ ID NO: 1. Понятно, что замены могут быть сделаны в соответствующих положениях в другом полипептиде MTSP-1 путем выравнивания с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 1, причем соответствующая позиция является выровненной позицией. Например, замена может быть осуществлена в домене протеазы MTSP-1 с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 2, или в эталонном домене протеазы MTSP-1 с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 4. В некоторых примерах аминокислотная замена(ы) может быть в соответствующем положении в полипептиде MTSP-1, как указано в SEQ ID NO: 4 или его варианте, имеющем по меньшей мере или по меньшей мере около 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 %, в частности, 95% или более идентичности последовательности, при условии, что полученный модифицированный полипептид MTSP-1 проявляет измененную (то есть повышенную) специфичность в отношении белка C3 комплемента по сравнению с эталонным полипептидом MTSP-1. В одном из примеров, любая одна или более из замен находятся в любой из SEQ ID NO: 1-4, при условии, что полученный модифицированный полипептид MTSP-1 проявляет измененную (то есть повышенную) специфичность в отношении белка C3 комплемента по сравнению с эталонным полипептидом MTSP-1, таким как, например, эталонный полипептид MTSP-1, представленный в любой из SEQ ID NO: 1-4.

Таблица 11. Активные варианты.

Соответствующая позиция (в SEQ ID NO:1)	Соответствующая позиция (химотрипсиновая нумерации)	Замена
637	38	H
640	41	S, R, A, D
658	59	F
661	60b	T, V
664	60e	S, R, K
666	60g	W

705	96	K, V, Y, L, I, P, E
706	97	G, T, E, D, N, Y, W
	97a	Вставка V, E, A, G, N
707	98	P, G, N
708	99	L
731	122	S
759	151	H, N
783	175	L
801	192	D, E, T

Примеры модификаций аминокислот в модифицированных полипептидах MTSP-1, представленных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, замену гистидином (H) в положении, соответствующем положению 38; S в положении, соответствующем положению 41; R в положении, соответствующем положению 41; A в положении, соответствующем положению 41; D в положении, соответствующем положению 41; F в положении, соответствующем положению 59; T в положении, соответствующем положению 60b; V в положении, соответствующем положению 60b; S в положении, соответствующем положению 60e; R в положении, соответствующем положению 60e; K в положении, соответствующем положению 60e; W в положении, соответствующем положению 60g; K в положении, соответствующем положению 96; V в положении, соответствующем положению 96; Y в положении, соответствующем положению 96; L в положении, соответствующем положению 96; Я в положении, соответствующем положению 96; P в положении, соответствующем положению 96; E в положении, соответствующем положению 96; G в положении, соответствующем положению 97; T в положении, соответствующем положению 97; E в положении, соответствующем положению 97; D в положении, соответствующем положению 97; N в положении, соответствующем положению 97; Y в положении, соответствующем положению 97; W в положении, соответствующем положению 97; V в положении, соответствующем положению 97a; E в положении, соответствующем положению 97a; A в положении, соответствующем положению 97a; G в положении, соответствующем положению 97a; N в положении, соответствующем положению 97a; P в положении, соответствующем положению 98; G в положении, соответствующем положению 98; N в положении, соответствующем положению 98; L в положении, соответствующем положению 99; S в положении, соответствующем положению 122; H в положении, соответствующем положению 151; N в положении, соответствующем положению 151; L в положении, соответствующем положению 175; D в положении, соответствующем положению 192; E в положении, соответствующем положению 192; T в положении, соответствующем положению 192, согласно химотрипсиновой нумерации, каждое со

ссылкой на положения аминокислот, указанные в SEQ ID NO: 1 или 3. S в положении, соответствующем положению 731 (положение 122S по химотрипсиновой нумерации соответствует положению 731 в SEQ ID NO: 1) заменяет свободный Cys, тем самым уменьшая тенденцию к агрегации.

Типичные модифицированные полипептиды MTSP-1, содержащие аминокислотные модификации, приведены в таблице 12a ниже. Таблица 12b включает в себя зрелую нумерацию для типичных модифицированных полипептидов MTSP-1. Идентификационный номер последовательности ссылается на примерный протеазный домен MTSP-1, который содержит указанные замены, которые включают замену в C122S для уменьшения или устранения агрегации. C122 представляет собой свободный цистеин, который может приводить к перекрестному сшиванию полипептидов протеаз; эта замена, хотя и выгодна, является необязательной. Понятно, что указанный (по SEQ ID NO.) протеазный домен является примерным, и полноразмерные молекулы и молекулы-предшественники, а также другие каталитически активные части протеазного домена, полноразмерного полипептида и предшественника полипептида могут включать указанные замены.

Таблица 12a. Модифицированные полипептиды MTSP-1.

Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO
I41R/F97T/Ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	21
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	22
Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	23
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	24
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	25
Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	26
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	27
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	28
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97Y/ins97aN/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	29
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	30
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/F97W/ins97aN/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	31

Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	32
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/F97E/ins97aV/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	33
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96L/F97D/ins97aG/T98N/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	34
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	35
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96V/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	36
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	37
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	38
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	39
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	40
I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T	41
I41D/C122S/G151N/Q192T	42
I41S/F99L/C122S/G151N/Q192V	43
I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T	44
I41D/Y59F/D96E/F99L/C122S/G151N/Q192T	45
I41D/Y59F/C122S/G151N/Q192T	46
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	47
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	48
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	49
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	50
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	51
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	52
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	53
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/C122S/G151H/Q175L/Q192D	54
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	55
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q192D	56
Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D	57
I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	58
Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	59
I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D	63
Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	64
Q38H/I41S/D60bY/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D/D217V	65
I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V	66
I41S/D60bY/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D/D217V	67
I41S/D96M/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V	68

Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO
I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192V/D217I	69
I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192H	70
I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192N/D217V	71
I41S/D60bY/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	72
Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V	73
I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192V	74
I41S/P49S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V	75
I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192N/I217V	76
I41T/F97W/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192G/D217L	77
I41G/F97L/F99L/C122S/Q175A/Q192T/D217V	78
I41G/F97V/F99L/C122S/G151Q/Q175M/Q192A/D217L	79
I41G/F97I/F99L/C122S/G151L/Q175M/Q192S/D217V	80
I41G/F97S/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G/D217I	81
F97E/F99L/C122S/D217I/K224N	154
C122S/G193A	155
C122S/G193E	156
D96_F97delinsWYY/T98P/F99L/C122S	157
F97D/F99L/C122S/Q192G	158
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q192G	159
C122S/G151N/G193A	160
H40R/I41H/C122S/G151N	161
H40R/I41H/F97D/C122S/G151N	162
H40R/I41H/F97E/C122S	163
F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	164
H40R/I41H/Y60gI/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175M/D217I/K224S	165
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/G151D/Q192G	166
H40R/I41H/F97D/F99L/Q192G	167
H40R/I41H/Y60gH/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175A/Q192H/D217I/K224R	168
H40R/I41H/Y60gF/F97D/F99L/C122S/Q192G/D217M/K224R	169
H40R/I41H/Y60gF/F97D/F99L/C122S/Q192G/D217R/K224A	170
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G/D217K/K224A	171
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192G/D217V/K224Y	172
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175K/Q192G/D217I/K224H	173
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192G/D217S	174
H40R/I41H/Y60gF/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192G/D217W/K224R	175
H40R/I41H/Y60gN/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175K/Q192S/D217S/K224L	176
H40R/I41H/Y60gH/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192G/D217I/K224L	177
H40K/I41L/Y60gF/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175R	178
H40R/I41H/Y60gI/F97D/F99L/C122S/G151N	179
H40K/I41M/Y60gG/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175R/Q192R/D217V/K224S	180
H40K/I41M/Y60gF/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	181
H40R/I41H/F97D/C122S/G151N/Q175M/Q192A/D217S/K224R	182
H40R/I41H/Y60gH/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192G/D217I/K224R	183
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/G151D/Q175M/Q192G/D217V	184
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192A/D217N/K224R	185
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192A/D217N/K224R	186
H40K/I41M/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192D/D217N/K224R	187
H40K/I41M/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192A/D217N/K224R	188
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192D/D217N/K224R	189
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175M/D217N/K224R	190
H40K/I41M/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192D/D217N/K224R	191
H40K/I41M/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192A/D217N/K224R	192

Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO
H40K/I41M/F97D/F99L/C122S/Q175M/D217N/K224R	193
H40R/I41H/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	194
H40R/I41H/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	195
H40R/I41H/F97E/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	196
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/G151N/Q192H	197
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/G151N/L153R	198
H40R/I41H/F97D/C122S/G151N/L153R/V202M	199
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/G151N/Q192H/P232S	200
H40R/I41H/F97D/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	201
H40R/I41H/F97D/C122S/G151N/L153R	202
H40K/I41M/F99L/C122S/T150A/G151R/Q192G	203
H40R/I41H/F97D/C122S/G133D/G151N	204
I41R/F99L/C122S/Q192G	205
H40R/I41H/F99L/C122S/G151K/Q192G	206
I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151E/Q175L/Q192E	207
K86R/K110R/C122S/K134R/K157R/K224R/K239R	208
H40R/I41H/K86R/F97D/K110R/C122S/K134R/G151N/K157R/K224R/K239R	209
K86R/F97T/ins97aE/T98G/F99L/K110R/C122S/K134R/K157R/Q175L/Q192E/K224R/K239R	210
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175R/Q192G/D217H/K224S	211
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q192G/D217I/K224S	212
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q192G/D217K/K224A	213
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175R/Q192G/D217E/K224R	214
H40R/I41H/F97D/C122S/Q175R/Q192G/D217I/K224Q	215
H40P/I41R/F99L/C122S/Q192G	216
H40P/I41R/F99L/C122S/G151K/Q192G	217
H40R/I41H/F99L/C122S/G151E/Q192G	218
I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151D/Q175L/Q192E	219
I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151D/Q175T/Q192E	220
I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151D/Q175T/Q192D	221
I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151E/Q175T/Q192D	222
H40P/I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	223
H40P/I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151D/Q175L/Q192E	224
I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	225
I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	226
I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175T/Q192E	227
I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175T/Q192D	228
I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	229
H40P/I41R/F99L/C122S/G151E/Q192G	230
I41R/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151E/Q175T/Q192E	231
I41R/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192E	232
I41R/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175I/Q192E	233
H40R/I41H/Y60gF/F97D/F99L/C122S/Q175K/Q192G/D217R/K224Q	234
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G/D217Q/K224R	235
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/G151N/Q192N/D217L/K224R	236
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/G151N/Q192H/D217K/K224A	237
ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/Q192G	238
F97N/ins97aT/T98Y/F99N/C122S	239
F97M/ins97aD/T98D/F99L/C122S/Q192T	240
ins97aV/F97Q/T98P/F99L/C122S/Q175F/Q192D	241
ins97aD/F97T/T98S/F99L/C122S/Q192E/D217Y/K224R	242
ins97aN/F97H/T98D/F99L/C122S/Q192E/D217Q/K224S	243
F97Q/ins97aT/T98M/C122S/Q192E/D217R/K224L	244

Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO
ins97aD/F97Q/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E/D217F/K224S	245
ins97aD/F97G/T98N/F99L/C122S/Q192E/D217Y/K224R	246
ins97aE/F97Y/T98S/F99L/C122S/Q192T/D217Q/K224R	247
ins97aG/F97N/T98D/F99L/C122S/Q192E/D217H/K224A	248
ins97aA/F97G/T98N/F99L/C122S/Q175M/Q192T/K224A	249
I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192D	250
I41R/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175I/Q192D	251
I41R/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151D/Q175I/Q192E	252
I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151D/Q175I/Q192D	253
S90T/D96A/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	254
Y59F/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	255
ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E/Q209L	256
Y59F/D96V/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	257
D96V/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	258
I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151S/Q175L/Q192E	259
E24K/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/A152S/Q175L/Q192D	260
ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/L153Q/Q175L/Q192D	261
ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/I136M/L155M/N170D/Q175L/Q192E	262
I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/A112V/C122S/Q175L/Q192E	263
Y59F/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	264
Y59F/G60dS/R84H/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E/V212I	265
Y59F/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/L153Q/Q175L/Q192E	266
I41R/Y59F/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	267
I41R/Y59F/G60dS/R84H/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E/V212I	268
I41R/Y59F/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/L153Q/Q175L/Q192E	269
I41R/F97W/F99L/C122S/G151N/Q192G	270
F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q192G	271
I41D/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	272
I41D/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	273
Q38E/H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q192G	274
H40R/I41H/F97D/F99L/Q175R/Q192G/D217E/K224R	275
I41R/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q192G	276
ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192E	277
I41R/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	278
Q38E/H40R/I41H/D60bE/F97D/F99L/C122S/Q192G	279
Q38E/H40R/I41H/D60bN/F97D/F99L/C122S/Q192G	280
Q38E/H40R/I41H/D60bK/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G	281
Q38E/H40R/I41H/D60bN/F60eT/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G	282
Q38R/I41S/D60bH/F60eV/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	283
Q38G/H40R/I41H/D60bK/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G	284
I41D/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E/Q209L	285
Q38G/H40R/I41H/D60bN/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G	286
Q38R/I41S/D60bH/F60eV/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	287
H40R/I41H/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175R/Q192G/D217E/K224R	288
Q38H/I41S/D60bA/F60eV/Y60gF/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192T	289
Q38E/I41S/D60bH/F60eI/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192V	290
Q38R/I41S/D60bH/F60eI/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	291
Q38E/I41S/D60bV/F60eK/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192I	292
Q38R/I41E/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192T	293
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	294
Q38H/I41A/D60bA/F60eR/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	295
F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	296
ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G	297

Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO
Q38G/H40R/I41H/D60bN/F60eT/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G	298
Q38G/H40R/I41H/D60bK/F60eT/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G	299
Q38E/H40R/I41H/D60bK/F60eT/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G	300
Q38H/I41S/D60bA/F60eV/Y60gF/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192T	301
Q38E/I41S/D60bH/F60eI/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192V	302
Q38R/I41S/D60bH/F60eI/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	303
Q38E/I41S/D60bV/F60eK/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192I	304
Q38R/I41E/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192T	305
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	306
Q38H/I41A/D60bA/F60eR/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	307
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	308
Q38H/I41S/D60bV/F60eQ/Y60gF/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192I	309
Q38H/I41A/D60bV/F60eI/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	310
Q38H/I41A/D60bV/F60eT/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	311
Q38H/I41A/F60eA/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	312
Q38H/I41A/D60bE/F60eH/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	313
Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	314
Q38H/I41A/D60bT/F60eH/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	315
Q38H/I41S/D60bS/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	316
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	317
Q38R/I41T/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G	318
Q38S/I41S/F60eR/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192S	319
Q38H/I41T/D60bV/F60eQ/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	320
Q38G/H40R/I41H/D60bH/F60eK/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/V183A/Q192G	321
Q38H/I41A/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	322
Q38L/I41T/D60bR/F60eL/Y60gM/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G	323
Q38F/I41S/D60bF/F60eR/Y60gF/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192V	324
Q38V/I41S/D60bT/F60eT/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175H/Q192S	325
Q38W/I41A/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151T/Q175S/Q192D	326
Q38T/I41S/D60bV/F60eR/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175R/Q192V	327
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175A/Q192D	328
Q38H/I41S/D60bT/F60eT/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192V	329
Q38Y/I41A/D60bL/F60eQ/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192A	330
Q38L/I41T/D60bA/F60eL/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175M/Q192T	331
Q38R/I41S/D60bY/F60eD/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192A	332
Q38W/I41S/D60bG/F60eI/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175A/Q192D	333
Q38T/I41S/D60bG/F60eM/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192S	334
I41T/D60bW/F60eH/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G	335
Q38D/I41S/D60bT/F60eR/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151K/Q175S/Q192V	336
Q38H/I41S/D60bF/F60eV/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192A	337
Q38L/I41A/D60bH/F60eT/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151Q/Q175A/Q192G	338
Q38H/I41A/D60bE/F60eH/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	339
Q38H/I41A/D60bV/F60eI/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	340
Q38E/I41S/D60bV/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	341
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192G	342

Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO
192D	
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175A/Q192D	343
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	344
Q38H/I41A/D60bT/F60eH/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	345
D60bY/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	346
I41T/D60bY/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	347
Q38E/I41S/D60bT/F60eR/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192V	348
Q38H/I41A/D60bK/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	349
Q38H/I41S/D60bA/F60eV/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E/Q209L	350
Q38H/I41A/D60bT/F60eR/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192V	351
Q38K/I41S/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192V	352
Q38F/I41A/D60bT/F60eG/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	353
Q38H/I41A/F60eH/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192A	354
Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192A	355
Q38H/I41A/D60bV/F60eA/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192V	356
Q38E/I41V/D60bF/F60eK/Y60gF/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	357
Q38H/H40P/I41A/F60eQ/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	358
Q38R/I41V/D60bV/F60eV/Y60gF/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	359
Q38L/H40P/I41T/D60bV/F60eH/Y60gL/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192A	360
Q38H/I41A/D60bV/F60eH/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	361
Q38H/I41S/D60bA/F60eV/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192V	362
Q38R/I41T/D60bH/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	363
Q38H/I41S/D60bT/F60eR/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	364
Q38K/I41T/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192A	365
Q38H/I41A/D60bT/F60eK/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	366
Q38L/I41T/D60bV/F60eH/Y60gL/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192S	367
ins97aA/F97G/T98L/C122S/Q175M/Q192A/D217I/K224R	368
Q38H/I41A/D60bY/F60eT/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	369
ins97aY/F97H/F99L/C122S/Q175M/Q192A/D217V	370
ins97aL/F97Q/T98G/F99L/C122S/Q175M/Q192S/D217I	371
ins97aY/F97G/T98V/C122S/Q175M/Q192S/D217V	372
Q38Y/I41S/D60bR/F60eE/Y60gF/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192V	373
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192V	374
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192V	375
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175A/Q192D	376
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	377
Q38H/I41A/D60bE/F60eH/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	378
Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	379
Q38H/I41A/D60bV/F60eI/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	380
Q38E/I41S/D60bV/F60eK/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	381
Q38H/I41S/L52M/D60bG/ins97aV/F97D/T98P/F99L/M117K/C122S/I136L/Q192G/D217A	382
Q38E/I41A/D60bH/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/Q192G/Q209L/D217H	383

Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO
I41S/D60bT/F93L/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217H	384
I41T/D60bH/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217I	385
Q38H/I41S/D60bS/ins97aV/F97D/T98P/F99L/M117L/C122S/I136T/Q192G/D217I	386
Q38R/I41T/D60bT/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136V/Q192G/D217N/L233Q	387
Q38H/I41A/D60bW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136M/Q192G/D217N	388
Q38H/I41S/P49Q/D60bS/F93L/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217Q	389
Q38H/I41S/D60bT/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136V/Q192G/D217S	390
Q38H/I41S/D60bS/F93L/D96Y/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136F/Q192G/D217V	391
Q38H/I41T/D60bH/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136F/L153P/Q192G/D217Y	392
Q38H/I41S/D60bT/F93L/ins97aV/F97D/T98P/F99L/S115N/C122S/Q192V/F208L/D217Q	393
Q38K/I41T/D60bY/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136T/Q192G/F208V/D217R	394
Q38H/I41S/D60bS/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136V/Q192G/D217V	395
Q38H/I41S/D60bG/ins97aV/F97D/T98P/F99L/M117T/C122S/N164D/Q192G/D217E	396
Q38K/I41S/D60bV/ins97aV/F97D/T98P/F99L/M117T/C122S/Q145E/Q175L/Q192G	397
Q38H/I41S/D60bT/F60eT/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192V	398
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	399
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	400
Q38H/I41S/L52M/D60bH/D96V/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/T150A/Q192G/Q209L/D217T	401
I41S/D60bS/D96V/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/Q192G/F208L/D217N	402
Q38H/I41S/D60bT/S90T/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/S127N/I136F/Q192G/D217Q	403
Q38H/I41S/D60bT/F93S/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136L/Q192G/D217A	404
I41S/D60bH/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136V/Q192G/D217N	405
L33M/Q38H/I41A/D60bA/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217N	406
Q38H/I41S/D60bY/D96Y/ins97aV/F97D/T98P/F99L/L106M/C122S/I136M/Q192G/Q209L/D217T	407
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/ins97aN/F97Y/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	408
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/ins97aA/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	409
Q38H/I41T/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/ins97aN/F97Y/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	410
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96Y/ins97aI/F97E/T98N/F99M/C122S/G151N/Q175L/Q192V	411
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96S/ins97aR/F97A/T98S/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192T	412
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	413
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	414
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/ins97aV/F97E/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	415
Q38H/I41S/D60bA/Y60gG/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/H143T/G151N/Q175L/Q192A	416
Q38H/I41S/D60bT/F60eH/Y60gF/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/H143R/G151N/Q175L/Q192S	417
Q38H/I41S/D60bS/F60eQ/Y60gF/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/H143R/G151N/Q175L/Q192T	418

Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO
Q38H/I41S/D60bF/F60eT/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/H143Q/G151N/Q175L/Q192G	419
Q38H/I41S/D60bF/F60eQ/Y60gF/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/H143A/G151N/Q175L/Q192A	420
Q38H/I41S/D60bT/F60eT/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/H143Q/G151Q/Q175L/Q192G	421
Q38H/I41S/D60bQ/F60eQ/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/H143Q/G151Q/Q175L/Q192G	422
Q38H/I41S/D60bS/F60eQ/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/H143A/G151N/Q175L/Q192G	423
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96Q/F97E/ins97aD/T98S/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192R	424
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96F/F97D/ins97aE/T98S/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192A	425
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96L/ins97aG/F97D/T98N/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	426
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/ins97aV/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	427
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/ins97aN/F97Y/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	428
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	429
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	430
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/ins97aV/F97E/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	431
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	432
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	433
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	434
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97D/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	435
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	436
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	437
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	438
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	439
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	440
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	441
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	442
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	443
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/C122S/G151H/Q175L/Q192E	444
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192E	445
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q192E	446
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L	447
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	448
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	449
Q38H/I41S/D60bT/F60eG/Y60gW/D96V/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	450
Q38K/I41G/F60eG/Y60gW/D96P/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	451
Q38Y/I41E/D60bS/F60eV/Y60gF/D96W/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	452

Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO
Q38H/I41S/D60bT/F60eG/D96Y/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	453
Q38V/I41G/F60eG/Y60gW/D96P/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	454
Q38Y/I41A/D60bT/F60eG/Y60gW/D96V/F97N/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	455
Q38H/I41S/D60bT/F60eG/D96P/F97N/T98G/F99L/C122S/G151Q/Q175L/Q192D	456
Q38K/I41G/D60bT/F60eG/Y60gW/D96P/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	457
Q38K/I41G/D60bT/F60eG/Y60gW/D96L/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	458
Q38E/I41S/D60bV/F60eK/Y60gW/D96P/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	459
Q38E/I41S/D60bW/F60eG/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	460
Q38M/I41S/F60eH/Y60gW/D96Y/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	461
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97D/ins97aE/T98G/F99M/C122S/G151N/Q175L/Q192R	462
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97E/ins97aT/T98G/F99M/C122S/G151N/Q175L/Q192G	463
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97E/ins97aS/T98G/F99M/C122S/G151N/Q175L/Q192G	464
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96W/F97D/ins97aD/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G	465
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97Y/ins97aE/T98G/F99M/C122S/G151N/Q175L/Q192R	466
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96W/F97D/ins97aT/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G	467
Q38H/I41S/D60bT/F60eK/Y60gF/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	468
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97S/ins97aH/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G	469
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97Y/ins97aN/T98G/F99M/C122S/G151N/Q175L/Q192G	470
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96F/F97S/ins97aD/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	471
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96F/F97Y/ins97aD/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	472
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/F97N/ins97aE/T98S/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	473
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/F97R/ins97aD/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	474
Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gF/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/H143R/G151N/Q175L/Q192V	475
Q38Y/I41S/D60bV/F60eR/Y60gF/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	476
Q38E/I41S/D60bV/F60eK/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	477
Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	478
Q38H/I41S/F60eT/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	479
Q38H/I41S/D60bT/F60eK/D96V/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	480
I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	481
Q38Y/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	482
Q38Y/I41S/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	483
Q38Y/I41S/D60bT/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	484
Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	485

Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO
Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	486
Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	487
Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	488
Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/C122S/G151N/Q175L/Q192D	489
Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q192D	490
Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L	491
Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	492
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/M117K/C122S/G151H/Q175L/Q192D	493
L36Q/Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	494
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/T150S/G151H/Q175L/Q192D/Q209L	495
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	496
I41G/F97A/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192G/D217L	497
I41G/F97S/F99L/C122S/G151N/Q175I/Q192T/D217T	498
I41R/F97A/F99L/C122S/G151N/Q175R/Q192G/D217Q	499
I41S/F97E/F99L/C122S/G151N/Q175G/Q192R/D217A	500
I41G/F97S/F99L/C122S/G151T/Q175R/Q192A/D217Y	501
I41G/F97L/F99L/C122S/G151N/Q175A/Q192V/D217R	502
I41G/F97T/F99M/C122S/G151D/Q175T/Q192T/D217V	503
I41G/F97L/F99L/C122S/G151T/Q175M/Q192D/D217M	504
F97S/F99L/C122S/G151N/Q175I/Q192T/D217T	505
I41G/F99L/C122S/G151N/Q175I/Q192T/D217T	506
I41G/F97S/C122S/G151N/Q175I/Q192T/D217T	507
I41G/F97S/F99L/C122S/Q175I/Q192T/D217T	508
I41G/F97S/F99L/C122S/G151N/Q192T/D217T	509
I41G/F97S/F99L/C122S/G151N/Q175I/D217T	510
I41G/F97S/F99L/C122S/G151N/Q175I/Q192T	511
F97R/ins97aT/T98V/C122S/Q175M/Q192T/D217S	512
F97V/ins97aH/T98R/F99L/C122S/Q175R/Q192G/D217S	513
F97Q/F99L/C122S/Q175N/Q192V/D217G	514
F97L/ins97aM/T98N/F99L/C122S/Q175T/Q192T/D217S	515
F97S/ins97aN/T98G/F99M/C122S/Q175T/Q192T/D217S	516
I41T/F97H/F99L/C122S/G151N/Q175H/Q192V/D217L	517
I41R/F97T/F99L/C122S/G151N/Q175T/Q192T/D217I	518
I41E/F97V/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192S/D217H	519
I41D/F97R/F99L/C122S/G151Q/Q175R/Q192V/D217L	520
I41E/F97R/F99L/C122S/G151Q/Q175G/Q192T/D217V	521
I41D/F97T/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192T/D217A	522
I41E/F97A/F99M/C122S/G151N/Q175R/Q192S/D217E	523
I41G/F99L/C122S/Q175I/Q192T/D217T	524
I41G/F99L/C122S/G151N/Q192T/D217T	525
I41G/F99L/C122S/G151N/Q175I/Q192T	526
F97V/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192S/D217H	527
I41E/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192S/D217H	528
I41E/F97V/F99L/C122S/Q175L/Q192S/D217H	529
I41E/F97V/F99L/C122S/G151N/Q192S/D217H	530
I41E/F97V/F99L/C122S/G151N/Q175L/D217H	531
I41E/F97V/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192S	532
F97R/F99L/C122S/G151Q/Q175R/Q192V/D217L	533
I41D/F99L/C122S/G151Q/Q175R/Q192V/D217L	534

Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO
I41D/F97R/F99L/C122S/Q175R/Q192V/D217L	535
I41D/F97R/F99L/C122S/G151Q/Q192V/D217L	536
I41D/F97R/F99L/C122S/G151Q/Q175R/D217L	537
I41D/F97R/F99L/C122S/G151Q/Q175R/Q192V	538
I41E/F97R/F99L/C122S/G151Q/Q175G/Q192T	539
I41D/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192T/D217A	540
I41D/F97T/F99L/C122S/Q175S/Q192T/D217A	541
I41D/F97T/F99L/C122S/G151N/Q192T/D217A	542
I41D/F97T/F99L/C122S/G151N/Q175S/D217A	543
I41D/F97T/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192T	544
F97T/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192T/D217A	545
I41S/F97Q/F99L/C122S/Q175W/Q192V/D217R	546
I41G/F97L/F99L/C122S/G151N/Q192V/D217L	547
I41G/F97A/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192S	548
I41G/F97V/F99L/C122S/G151N/Q192T/D217V	549
I41D/F97R/F99L/C122S/Q175L/Q192T/D217I	550
I41E/F97S/F99L/C122S/Q175L/Q192V/D217A	551
F97L/F99L/C122S/Q175K/Q192V/D217M	552
F97E/F99L/C122S/G151A/Q192V	553
F97E/F99L/C122S/Q175H/Q192V/D217P	554
F97R/ins97al/T98P/C122S/Q175M/Q192V/D217I	555
I41D/F99L/C122S/G151N/Q192T/D217A	556
I41D/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192T	557
I41D/F97T/F99L/C122S/G151N/Q192T	558
I41D/F99L/C122S/G151N/Q192T	559
I41D/F99L/C122S/Q175S/Q192T	560
I41D/F99L/C122S/Q192T	561
Q38R/I41G/Y60gG/F99M/C122S/G151N/Q192R	562
Q38K/I41G/Y60gG/F99L/C122S/G151N/Q192H	563
Q38L/I41R/Y60gF/F99L/C122S/G151N/Q192A	564
Q38K/I41D/Y60gG/F99L/C122S/G151N	565
Q38R/I41R/Y60gF/F99L/C122S/G151N/Q192G	566
Q38S/I41S/Y60gW/F99L/C122S/G151D/Q192T	567
Q38K/I41G/Y60gW/F99L/C122S/G151N/Q192A	568
Q38H/I41S/Y60gW/C122S/G151H/Q192A	569
Q38K/I41S/Y60gW/F99L/C122S/G151N/Q192G	570
Q38F/I41S/Y60gA/C122S/G151N/Q192R	571
Q38R/I41S/Y60gW/F99L/C122S/G151N/Q192E	572
Q38K/I41R/Y60gG/F99L/C122S/G151N/Q192G	573
Q38R/I41R/F99L/C122S/G151N/Q192G	574
Q38R/I41R/Y60gL/F99L/C122S/G151N/Q192G	575
I41E/C122S/G151N/Q175L/Q192A	576
I41S/F99M/C122S/G151N/Q175L/Q192G	577
I41E/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192A	578
I41S/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192V	579
I41G/F99L/C122S/G151N/Q192A	580
I41S/F99M/C122S/G151N/Q175G/Q192R	581
I41E/F99L/C122S/G151N/Q175R/Q192H	582
I41S/F99M/C122S/G151N/Q175E/Q192R	583
I41E/F99L/C122S/G151N/Q192V	584
I41E/F99L/C122S/G151N/Q192S	585
I41S/F99L/C122S/G151N/Q175P/Q192V	586
I41E/F99L/C122S/G151N/Q175G/Q192T	587

Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO
I41S/C122S/G151N/Q175R/Q192R	588
I41S/F99M/C122S/G151N/Q175P/Q192S	589
I41S/C122S/G151N/Q175D/Q192R	590
I41E/F99L/C122S/G151N/Q175R/Q192T	591
I41G/F99L/C122S/G151N/Q175R/Q192A	592
F99L/C122S/G151N/Q192T	593
I41D/F99L/C122S/G151N	594
I41S/F99L/C122S/Q175P/Q192V	595
I41S/F99L/C122S/G151N/Q175P	596
I41E/F99L/C122S/Q175G/Q192T	597
I41E/F99L/C122S/G151N/Q175G	598
I41D/Y59F/F99L/C122S/G151N/Q192T/V213A	599
I41D/G43A/F99L/C122S/G151N/Q192T/P232S/K239R	600
I41D/G43A/D96E/F99L/C122S/G151N/Q192T	601
I41D/D96E/F99L/C122S/G151N/Q192T	602
I41D/D96E/C122S/G151N/Q192T	603
I41D/D96E/F99L/C122S/G151N/Q192T/D217E	604
I41D/F99L/M117T/C122S/G151N/Q192T/A204D/D217E	605
I41D/F99L/C122S/G151N/Q192T/D217E	606
I41D/F99L/C122S/I136M/G151N/Q192T/D217L/K224R	607
I41D/F60eI/D96E/F99L/C122S/G151N/Q192T	608
I41D/C122S/G151N/Q192T/D217E	609
D96E/C122S/G151N/Q192T	610
Y59F/C122S/G151N/Q192T	611
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	612
I41S/ins97aV/C122S/Q192D	613
I41S/F97L/F99L/C122S/Q192S	614
I41T/F97R/ins97aV/T98L/C122S/Q192S	615
I41S/F97V/T98N/F99L/C122S/Q192S	616
I41S/F97G/ins97aA/T98L/C122S/Q192A	617
I41S/F97D/F99L/C122S/Q192V	618
I41E/F97L/F99L/C122S/Q192A	619
I41S/F97A/ins97aV/T98L/C122S/Q192A	620
I41S/F97del/T98S/F99L/C122S/Q192S	621
I41A/Y60gW/D96F/F97G/F99M/C122S/Q175W/Q192A	622
I41G/Y60gW/F99L/C122S/Q175R/Q192S	623
I41A/Y60gW/ins97aE/F99L/C122S/Q175M/Q192T	624
I41T/ins97aA/F99Y/C122S/Q175L/Q192A	625
I41A/ins97aY/F99L/C122S/Q175R/Q192H	626
I41S/ins97aT/F99L/C122S/Q175R/Q192H	627
I41S/Y60gW/ins97aN/F99L/C122S/Q175R/Q192T	628
Q38H/I41S/D96S/ins97aK/C122S/G151N/Q192A	629
Q38H/I41A/D96A/ins97aA/C122S/G151D/Q192T	630
Q38H/I41S/D96Q/ins97aT/C122S/G151N/Q192A	631
Q38H/I41T/D96M/ins97aA/C122S/G151D	632
Q38Y/I41A/D96I/ins97aQ/C122S	633
Q38H/I41S/D96K/ins97aT/C122S/G151K/Q192A	634
Q38W/I41S/D96R/ins97aA/C122S/G151N/Q192A	635
Q38H/I41A/D96R/ins97aQ/C122S	636
Q38F/I41V/D96Q/ins97aT/C122S/G151D	637
L33M/Q38F/I41S/D96A/ins97aW/C122S/G151N/Q192S	638
Q38H/I41S/D96V/ins97aA/C122S/G151N/Q192A	639
Q38H/I41T/D96K/ins97aL/C122S/G151N/Q192A	640

Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO
Q38H/I41S/D96Q/ins97aA/C122S/Q192T	641
Q38W/I41V/D96R/ins97aA/C122S/G151N	642
Q38Y/I41T/D96M/ins97aS/C122S/G151N	643
Q38H/I41S/D96K/ins97aS/C122S/G151P/Q192S	644
Q38H/I41S/D96G/ins97aG/C122S/G151N/Q192A	645
Q38H/I41S/D96K/ins97aD/C122S/G151N/Q192S	646
I41S/D96E/ins97aG/C122S/G151Q/Q192A	647
I41S/Y59F/ins97aV/C122S/G187D/Q192V/D217V	648
A35V/I41S/Y59F/C122S/Q192D/D217V	649
I41S/F93L/ins97aV/C122S/Q192V/D217V	650
I41S/S90P/ins97aV/C122S/Y146E/Q192N/D217V	651
I41S/S90T/ins97aV/C122S/Q192N/D217V	652
I41S/S90T/ins97aV/C122S/Q192V/D217V	653
I41S/Y59F/ins97aV/C122S/Q192G	654
I41S/Y59F/F97S/ins97aV/S116Y/C122S/Q192G/D217V	655
I41S/ins97aV/C122S/Q192G/Q209L	656
Q38H/I41S/ins97aV/A112V/C122S/Q192A/Q209L	657
I41S/ins97aV/C122S/Q192V/D217V	658
I41S/Y59F/ins97aV/C122S/Q192A	659
I41A/F97G/ins97aM/T98L/C122S	660
I41G/F97E/F99L/C122S/Q192A	661
I41S/F97V/ins97aV/T98P/C122S	662
I41S/T98S/F99L/C122S/Q192A	663
I41S/F97Q/F99L/C122S/Q192S	664
I41G/F97L/F99L/C122S/Q192S	665
I41S/F97G/ins97aA/T98P/C122S/Q192A	666
I41A/F97G/ins97aV/T98E/C122S	667
I41A/F97S/ins97aA/C122S	668
I41A/F97W/T98S/F99L/C122S/Q192A	669
I41L/N95D/D96T/F97W/F99L/C122S/Q192A	670
I41T/Y60gL/N95D/D96F/F97S/F99L/C122S/Q175S/Q192A	671
I41A/Y60gW/N95D/D96F/F97G/F99L/C122S/Q175H/Q192A	672
I41A/Y60gW/F99L/C122S/Q175T/Q192A	673
Q38M/I41T/D96M/ins97aH/C122S/G151E	674
Q38H/I41T/D96R/ins97aG/C122S/G151S	675
I41S/D60bY/ins97aV/T98N/C122S/Q192H	676
I41S/Y59F/D60bY/ins97aV/C122S/Q192G	677
I41S/D60bY/ins97aV/A112V/C122S/Q192G/Q209L	678
A35T/I41S/Y59F/ins97aV/C122S/Y146F/V183A/Q192G/R235H	679
I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175H/Q192D	680
I41S/ins97aV/C122S/N164D/Q192G/R235H	681
I41S/Y59F/ins97aV/C122S/Q192G/N223D	682
I41S/ins97aV/C122S/N164D/Q192G/R235L	683
I41S/Y59F/F97Y/ins97aV/C122S/Q192G	684
I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192V	685
I41S/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192G/D217V	686
I41S/F97L/F99L/C122S/G151N/Q192G/D217V	687
I41S/F97S/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192A/D217L	688
I41G/F97R/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192S/D217V	689
I41T/F97L/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192S/D217W	690
I41D/F97T/F99M/C122S/Q192V/D217M	691

Таблица 126. Модифицированные полипептиды MTSP-1

Нумерация зрелого MTSP-1	Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO
I640R/F706T/InsE/T707G/F708G/C731S/G759N/Q783L/Q802E	I41R/F97T/Ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	21
Q637H/I640A/D661V/F664R/Y666W/F706T/InsE/T707G/F708L/C731S/G759N/Q783L/Q802D	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	22
Q637H/I640A/D661T/F664K/Y666W/F706T/InsE/T707G/F708L/C731S/G759N/Q783L/Q802D	Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	23
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/F706D/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802E	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	24
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/F706D/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	25
Q637H/I640A/D661T/F664K/Y666W/F706T/InsE/T707G/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	26
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/F706D/InsV/T707P/F708L/C731S/G759N/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	27
Q637H/I640A/D661V/F664R/Y666W/F706T/InsE/T707G/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	28
Q637H/I640A/D661V/F664R/Y666G/D705I/F706Y/InsN/T707G/F708L/C731S/G759N/Q783L/Q802D	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97Y/ins97aN/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	29
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706D/InsA/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	30
Q637H/I640A/D661V/F664R/Y666W/D705P/F706W/InsN/T707G/F708L/C731S/G759N/Q783L/Q802E	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/F97W/ins97aN/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	31
Q637H/I640A/D661V/F664R/Y666W/D705I/F706N/T707G/F708L/C731S/G759N/Q783L/Q802D	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	32
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705Y/F706E/InsV/T707G/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/F97E/ins97aV/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	33
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705L/F706D/InsG/T707G/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802E	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96L/F97D/ins97aG/T98N/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	34
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	35
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705V/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96V/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	36
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706D/InsA/T707P/F708L/C731S/G759N/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	37
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	38

Нумерация зрелого MTSP-1	Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	39
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L	40
I640E/F708L/C731S/G759N/Q802T	I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T	41
I640D/C731S/G759N/Q802T	I41D/C122S/G151N/Q192T	42
I640S/F708L/C731S/G759N/Q802V	I41S/F99L/C122S/G151N/Q192V	43
I640E/F708L/C731S/G759N/Q802T	I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T	44
I640D/Y658F/D705E/F708L/C731S/G759N/Q802T	I41D/Y59F/D96E/F99L/C122S/G151N/Q192T	45
I640D/Y658F/C731S/G759N/Q802T	I41D/Y59F/C122S/G151N/Q192T	46
I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	47
Q637H/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	48
Q637H/I640S/F664S/Y666W/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	49
Q637H/I640S/D661T/Y666W/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	50
Q637H/I640S/D661T/F664S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	51
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706G/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	52
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706G/InsV/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	53
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706G/InsV/T707P/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/C122S/G151H/Q175L/Q192D	54
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	55
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q192D	56
Q637H/I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802D	Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D	57
I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q783L/Q802D	I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	58
Q637H/I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	59
I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802D	I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D	63
Q637H/I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F	Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P	64

Нумерация зрелого MTSP-1	Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO
708L/C731S/Q783L/Q802D	/F99L/C122S/Q175L/Q192D	
Q637H/I640S/D661Y/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802D/D828V	Q38H/I41S/D60bY/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D/D217V	65
I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802D/D828V	I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V	66
I640S/D661T/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802D/D828V	I41S/D60bY/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D/D217V	67
I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802G/D828V	I41S/D96M/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V	68
I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802V/D828I	I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192V/D217I	69
I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802H	I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192H	70
I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802N/D828V	I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192N/D217V	71
I640S/D661Y/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q783L/Q802D	I41S/D60bY/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	72
Q637H/I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802G/D828V	Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V	73
I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q783L/Q802V	I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192V	74
I640S/P648S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q783L/Q802G/D828V	I41S/P49S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V	75
I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q783L/Q802V/D828V	I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192N/D217V	76
I640T/F706W/F708L/C731S/G759N/Q783M/Q802G/D828L	I41T/F97W/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192G/D217L	77
I640G/F706L/F708L/C731S/Q783A/Q802T/D828V	I41G/F97L/F99L/C122S/Q175A/Q192T/D217V	78
I640G/F706L/F708L/C731S/G759N/Q783M/Q802A/D828L	I41G/F97V/F99L/C122S/G151Q/Q175M/Q192A/D217L	79
I640G/F706I/F708L/C731S/G759L/Q783M/Q802S/D828V	I41G/F97I/F99L/C122S/G151L/Q175M/Q192S/D217V	80
I640G/F706S/F708L/C731S/G759N/Q783L/Q802G/D828I	I41G/F97S/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G/D217I	81

2. Дополнительные модификации

Любой из модифицированных полипептидов MTSP-1, представленных в настоящем документе, может содержать любую одну или более из дополнительных модификаций. Дополнительные модификации могут включать, например, любую аминокислотную замену, делецию или вставку, известную в данной области, обычно любую, которая увеличивает специфичность модифицированного полипептида MTSP-1 для инактивации расщепления белка C3 комплемента по сравнению с немодифицированным или эталонным полипептидом MTSP-1, таким как протеазный домен. Любой модифицированный полипептид MTSP-1, представленный в настоящем документе, может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше дополнительных модификаций

аминокислот. Также рассматриваются модификации, которые изменяют любую другую интересующую деятельность. В данной области давно известно, что аминокислотные модификации первичной последовательности являются аддитивными [52]. Примеры дополнительных модификаций, которые могут быть включены в модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, описанные в патентах США: US 7,939,304; 8,211,428; 8,445,245; 9,290,757; 9,359,598; 8,663,633; патентных публикациях США: US 2003/0119168; US 2007/0093443; US 2010/0189652; US 2010/0105121; US 2012/0244139; US 2014/0242062; US 2004/0146938; и US 2009/0136477; описанные в [24, 36, 37, 53 – 58]; и в международных патентных публикациях: WO 2015/166427 и WO 2015/085395. Неограничивающие примеры примерных модификаций аминокислот, описанных в данной области техники, включают любую одну или более из: R85H, N109Q, G149N, D251E, N302Q, Q348H, G349Y, R381S, P452R, D482Y, N485Q, D519Y, S524M, D555Y, C574R, D598Y, K600R, C602S, C604S, V615I, V616L, V616G, G617N, G617L, G618L, D622E, Q637D, I640T, I640A, I640L, I640F, I640D, I640E, C641S, L651M, H656A, C657S, D661I, D661F, D661R, D661A, R662F, R662D, R662A, R662W, Y666S, T673K, A674V, H679R, S685R, F702L, N704K, D705A, D705V, D705F, D705S, D705T, F706N, F706D, F706E, F706A, F706W, F706R, F706Y, F706L, T707P, F708Y, F708W, F708N, F708D, F708E, F708A, F708V, F708R, F708I, F708L, F708T, F708S, F708G, D711A, C731S, A735T, V738D, P740S, I745T, I745V, H752R, T753I, T755F, T755N, T755D, T755E, T755A, T755W, T755R, G756E, G759L, I762V, N772Q, N772D, T774A, T775P, C776S, L779F, L780N, L780D, L780E, L780A, L780V, L780F, L780R, P781S, Q780N, Q780D, Q780E, Q780A, Q780V, Q780F, Q780R, P781S, Q782H, Q782A, Q782V, Q782F, Q782R, Q782K, Q782L, Q782Y, Q783D, Q783E, Q783A, Q783V, Q783H, Q783N, Q783L, Q783F, Q783W, Q783Y, Q783R, Q783K, M788E, M788Y, M788R, M788A, C790S, F793L, C801S, Q802A, Q802V, Q802D, Q802R, Q802F, Q802X, Q802L, Q802I, Q802E, Q802K, Q802Y, Q802H, S805A, S811I, Q820L, W826F, W826Y, W826I, W826D, W826R, W826X, G827R, D828A, D828V, D828F, D828E, D828R, D828Q, D828N, D828H, C830S, Q832D, Q832L, Q832E, K835A, K835F, K835V, K835D, K835L, K835R, K835N, K835T, K835Y, K835S, K835F, R841W, F845L и V855G, в соответствии с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 1. Дополнительные модификации включают замены аминокислот, которые вносят сайт гликозилирования.

Модифицированные полипептиды MTSP-1 включают те, которые содержат химические или посттрансляционные модификации. В некоторых примерах модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, не содержат химических или посттрансляционных модификаций. Химические и посттрансляционные

модификации включают, но не ограничиваются ими, ПЭГилирование, сиаилирование, альбуминирование, гликозилирование, фарнезилирование, карбоксилирование, гидроксилирование, фосфорилирование и другие модификации полипептидов, известные в данной области. Кроме того, в дополнение к любой одной или более из модификаций аминокислот, таким как аминокислотные замены, раскрытые в данном документе, модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, могут быть конъюгированы или слиты с любым фрагментом с использованием любого метода, известного в данной области техники, включая химические и рекомбинантные методы, при условии, что полученный полипептид сохраняет способность ингибировать или инактивировать расщепление белка C3 комплемента.

Например, в дополнение к любой одной или более из модификаций аминокислот, таким как аминокислотные замены, раскрытые в данном документе, модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, также могут содержать другие модификации, которые присутствуют или не присутствуют в первичной последовательности полипептида, включая: но не ограничиваясь этим, модификация углеводной частью, частью полиэтиленгликоля (ПЭГ), частью сиаилирования, Fc-доменом из иммуноглобулина G или любым другим доменом или частью. Например, такие дополнительные модификации могут быть сделаны для увеличения стабильности или периода полувыведения белка из сыворотки.

а. Снижение иммуногенности

Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, могут быть модифицированы для снижения иммуногенности. На снижение иммуногенности могут влиять изменения последовательности, которые исключают антигенные эпитопы из полипептида, или изменения посттрансляционных модификаций. Специалист в данной области техники знаком с методами идентификации антигенных эпитопов в полипептиде (см., например, [59 – 60]). В некоторых примерах одну или более из аминокислот можно модифицировать для удаления или изменения антигенного эпитопа. В другом примере изменение гликозилирования белка также может влиять на иммуногенность. Например, предполагается изменение гликозилирования пептида, при условии, что полипептиды сохраняют способность осуществлять ингибирующее или инактивационное расщепление белка C3 комплемента. Сайты гликозилирования могут быть удалены одиночными мутациями. Сайты гликозилирования могут быть добавлены путем введения канонической последовательности, такой как вставка или одиночная или множественная мутация, такая как NXS(T), где X не является пролином. Сайты гликозилирования также могут увеличивать период полувыведения из сыворотки.

6. Fc домены

Модифицированные полипептиды MTSP-1 могут быть связаны с областью Fc полипептида иммуноглобулина. Как правило, такое слияние сохраняет по меньшей мере функционально активный шарнир, домены C_H2 и C_H3 константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Например, полноразмерная последовательность Fc IgG1 включает аминокислоты 99–330 из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 100. Примерная последовательность Fc для hIgG1 изложена в SEQ ID NO: 101. Она содержит почти всю шарнирную последовательность, соответствующую аминокислотам 100–110 в SEQ ID NO: 100 и полную последовательность для доменов C_H2 и C_H3, указанную в SEQ ID NO: 100.

Другой типичный Fc полипептид описан в международной патентной публикации № WO 93/10151 и представляет собой одноцепочечный полипептид, простирающийся от N-концевой шарнирной области до нативного C-конца Fc области антитела IgG1 человека (SEQ ID № 100). Точный сайт, на котором осуществляется связывание, не является критическим: конкретные сайты хорошо известны и могут быть выбраны для оптимизации биологической активности, секреции или характеристик связывания полипептида НАВР. Например, другие типичные Fc последовательности полипептидов начинаются с аминокислоты C109 или P113 из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 101 (см., например, патентную публикацию США: US 2006/0024298).

В дополнение к Fc hIgG1, также можно использовать и другие Fc области. Например, если эффекторные функции, опосредованные взаимодействиями Fc/FcγR, должны быть минимизированы, то предполагается слияние с изотипами IgG, которые плохо рекрутируют комплемент или эффекторные клетки, такими как, например, Fc IgG2 или IgG4. Кроме того, слитые Fc могут содержать последовательности иммуноглобулина, которые в значительной степени кодируются генами иммуноглобулина, принадлежащими к любому из классов антител, включая, но не ограничиваясь ими, IgG (включая подклассы человека IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA (включая подклассы человека IgA1 и IgA2), классы антител IgD, IgE и IgM. Линкеры могут быть использованы для ковалентного связывания Fc с другим полипептидом с образованием химерного Fc.

Модифицированные Fc домены также хорошо известны. В некоторых примерах область Fc модифицирована таким образом, что она проявляет измененное связывание с FcR, что приводит к изменению (т.е. она становится больше или меньше) эффекторной функции, по сравнению с эффекторной функцией Fc области тяжелой цепи иммуноглобулина дикого типа. Таким образом, модифицированный Fc домен может иметь измененную аффинность, включая, но не ограничиваясь этим, повышенную или низкую аффинность к Fc рецептору, или ее отсутствие. Например, разные подклассы IgG имеют

различное сродство к FcγR, причем IgG1 и IgG3 обычно значительно лучше связываются с рецепторами, чем IgG2 и IgG4. Кроме того, разные FcγR опосредуют разные эффекторные функции. FcγR1, FcγRIIa/c и FcγRIIIa являются положительными регуляторами активации, вызванной иммунным комплексом, характеризующейся наличием внутриклеточного домена, который имеет мотив активации иммунорецептора на основе тирозина (IT AM). FcγRIIb, однако, имеет иммунорецепторный мотив ингибирования на основе тирозина (ITFM) и поэтому является ингибирующим. Изменение аффинности Fc области к рецептору может модулировать эффекторные функции и/или фармакокинетические свойства, связанные с Fc доменом. Модифицированные Fc-домены известны специалисту в данной области техники и описаны в литературе (см., например, патент США: US 5,457,035; патентную публикацию США: US 2006/0024298; и международную патентную публикацию: WO 2005/063816).

Полученные химерные полипептиды, содержащие фрагменты Fc, и образованные из них мультимеры, могут быть легко очищены с помощью аффинной хроматографии на колонках с белком А или белком G.

в. Конъюгация до полимеров

В некоторых примерах модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, конъюгированы с полимерами. Полимеры могут увеличивать размер полипептида для уменьшения почечного клиренса и, таким образом, увеличивать период полувыведения, или могут модифицировать структуру полипептида для увеличения периода полужизни или снижения иммуногенности. Типичные полимеры, которые могут быть конъюгированы с полипептидами MTSP-1, включают природные и синтетические гомополимеры, такие как полиолы (т.е. поли-ОН), полиамины (т.е. поли-NH₂) и поликарбоновые кислоты (т.е. поли-COOH), и другие гетерополимеры, т.е. полимеры, содержащие одну или несколько различных групп сочетания, например гидроксильная группа и аминогруппы. Примеры подходящих полимерных молекул включают полимерные молекулы, выбранные из группы, состоящей из: полиалкиленоксидов (ПАО), таких как полиалкиленгликоли (ПАГ), включая полиэтиленгликоли (ПЭГ), метоксиполиэтиленгликоли (мПЭГ) и полипропиленгликоли, ПЭГ-глицидиловые эфиры (эпокс-ПЭГ), ПЭГ-оксикарбонилимидазолы (CDI-ПЭГ), разветвленные полиэтиленгликоли (ПЭГ), поливиниловый спирт (ПВС), поликарбоксилаты, поливинилпирролидон, поли- D, L- аминокислоты, ангидрид полиэтилен-кумалеиновой кислоты, ангидрид полистирол-кумалеиновой кислоты; декстранов, включая карбоксиметил-декстрану, гепарина, гомологичного альбумина, целлюлозы, включая метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, этилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу,

карбоксиэтилцеллюлозу и гидроксипропилцеллюлозу; гидролизатов хитозанов, крахмалов, таких как гидрокси–этил–крахмал и гидроксипропил –крахмал, гликогена, агарозы и их производных, гуаровой камеди, пуллулана, инулина, ксантановой камеди, каррагинана, пектина, гидролизатов альгиновой кислоты и биополимеров.

Как правило, полимеры представляют собой полиалкиленоксиды (РАО), такие как полиэтиленоксиды, такие как ПЭГ, обычно мПЭГ, которые имеют мало реакционноспособных групп, способных к сшиванию. Обычно полимеры представляют собой нетоксичные полимерные молекулы, такие как (метокси)полиэтиленгликоль (мПЭГ), которые могут быть ковалентно конъюгированы с полипептидами MTSP–1 (например, с группами присоединения на поверхности белка) с использованием относительно простой химии.

Подходящие полимерные молекулы для присоединения к полипептидам MTSP–1 включают, но не ограничиваются ими, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и производные ПЭГ, такие как метоксиполиэтиленгликоли (мПЭГ), простые ПЭГ–глицидиловые эфиры (эпокс–ПЭГ), ПЭГ–оксикарбонилимидазол (CDI–ПЭГ), разветвленные ПЭГ и полиэтиленоксид (ПЭО) [61 – 65]. Полимерная молекула может иметь молекулярную массу, обычно находящуюся в диапазоне от примерно 3 кДа до примерно 60 кДа. В некоторых вариантах осуществления полимерная молекула, которая конъюгирована с полипептидом MTSP–1, представленным в настоящем документе, имеет молекулярную массу 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 или более 60 кДа.

Способы модификации полипептидов путем ковалентного присоединения ПЭГ (конъюгирования) или производного ПЭГ (т.е. "ПЭГилирования") хорошо известны в данной области (см. публикации и патенты США: US 2006/0104968, US 5672662, US 6737505, и US 2004/0235734). Методы ПЭГилирования включают, но не ограничиваются ими, специализированные линкеры и химию сочетания [66], присоединение множества групп ПЭГ к одному сайту конъюгации (например, путем использования разветвленных ПЭГ [67]), сайт–специфическое ПЭГилирование и/или моно–ПЭГилирование [68] и сайт–направленное ферментативное ПЭГилирование [69 – 76]. Способы и методики, описанные в данной области техники, могут продуцировать белки, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 ПЭГ или производных ПЭГ, присоединенных к одной молекуле белка (см. патентную публикацию США: US 2006/0104968).

В данной области были описаны многочисленные реагенты для ПЭГилирования. Такие реагенты включают, но не ограничиваются ими, N–гидроксисукцинимидил (NHS) активированный ПЭГ, сукцинимидил мПЭГ, мПЭГ2–N–гидроксисукцинимид, мПЭГ сукцинимидил альфа–метилбутаноат, мПЭГ сукцинимидилпропионат, мПЭГ

сукцинимидил бутаноат, мПЭГ карбоксиметил 3-гидроксипропановой кислоты, сукцинимидила эфир, гомобифункциональный ПЭГ-сукцинимидил пропионат, гомобифункциональный ПЭГ пропиональдегид, гомобифункциональный ПЭГ бутиральдегид, ПЭГ малеимид, ПЭГ гидразид, п-нитрофенил-карбонат ПЭГ, Мпэг-бензотриазол карбонат, пропиональдегидный ПЭГ, мПЭГ бутиральдегид, разветвленный мПЭГ2 бутиральдегид, мПЭГ ацетил, мПЭГ пиперидон, мПЭГ метилкетон, мПЭГ "линкерный" малеимид, мПЭГ винилсульфон, мПЭГ тиол, мПЭГ ортопиридилтиоэфир, мПЭГ ортопиридидисульфид, Fmoc-ПЭГ-NHS, Boc-ПЭГ-NHS, винилсульфон ПЭГ-NHS, акрилат ПЭГ-NHS, флуоросцеин ПЭГ-NHS и биотин ПЭГ-NHS (см., например, [77 – 78]; Патенты США: US 5,672,662; US 5,932,462; US 6,495,659; US 6,737,505; US 4,002,531; US 4,179,337; US 5,122,614; US 5,183,550; US 5,324, 844; US 5,446,090; US 5,612,460; US 5,643,575; US 5,766,581; US 5,795, 569; US 5,808,096; US 5,900,461; US 5,919,455; US 5,985,263; US 5,990, 237; US 6,113,906; US 6,214,966; US 6,258,351; US 6,340,742; US 6,413,507; US 6,420,339; US 6,437,025; US 6,448,369; US 6,461,802; US 6,828,401; и US 6,858,736; Патентные публикации США: US 2001/0021763; US 2001/0044526; US 2001/0046481; US 2002/0052430; US 2002/0072573; US 2002/0156047; US 2003/0114647; US 2003/0143596; US 2003/0158333; US 2003/0220447; US 2004/0013637; US 2004/0235734; US 2005/000360; US 2005/0114037; US 2005/0171328; и US 2005/0209416; Европейские патентные публикации: EP 01064951 и EP 0822199; и Международные патентные публикации: WO 00/176640; WO 00/02017; WO 02/49673; WO 94/28024; и WO 01/87925).

г. Домены белковой трансдукции

Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, могут быть связаны, так, например, они могут представлять собой слитый белок, содержащий антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с доменом белковой трансдукции (PTD), который увеличивает удержание антитела в целевом сайте для терапии, таком как участок слизистой оболочки, таком как глаз. Любая PTD может быть использована для терапии, при условии, что она способствует связыванию с клеточными поверхностями-мишенями в терапевтическом сайте (например, слизистой участке) и/или поглощению модифицированного полипептида MTSP-1 клетками-мишенями в терапевтическом сайте (например, в слизистой участке, таком как глаз).

Обычно PTD включают короткие катионные пептиды, которые могут связываться с поверхностью клетки посредством электростатического прикрепления к клеточной мембране и поглощаться клеткой путем транслокации мембраны [79]. Представляемые PTD обычно взаимодействуют с клеткой-мишенью посредством связывания с гликозаминогликанами (GAG), такими как, например, гиалуроновая кислота, гепарин,

гепарансульфат, дерматансульфат, кератинсульфат или хондроитинсульфат и их производные.

Домен белковой трансдукции (PTD) может иметь любую длину. Обычно длина PTD составляет от 5 или около 5 до 100 или около 100 аминокислот. Например, длина PTD может составлять от 5 или около 5 до 25 или около 25 аминокислот в длину. В некоторых примерах PTD состоит из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот в длину.

Одна PTD или их множество могут быть конъюгированы с модифицированным полипептидом MTSP-1. Их преимущественно используют для лечения глазных или офтальмологических расстройств, таких как диабетическая ретинопатия или дегенерация желтого пятна, включая AMD. Например, множественные копии одного и того же PTD (например, димера, тримера, тетрамера, пентамера, гексамера, гептамера, октамера, нонамера, декамера или более крупного мультимера) или разных PTD могут быть конъюгированы с модифицированным полипептидом MTSP-1.

Некоторые белки и их пептидные производные обладают свойствами интернализации клеток. Типичные PTD известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, PTD, перечисленные в приведенной ниже Таблице 13, включая, например, PTD, полученные из TAT вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1) (SEQ ID NO: -135; [80]), белок оболочки вируса герпеса VP22 (SEQ ID NO: 140; [81]), гомеотический белок *Drosophila melanogaster* Antennapedia (Antp) белок (Пенетратин PTD; SEQ ID NO: 112; [82]), протергин-1 (PG-1), антимикробный пептид SynB (например, SynB1 (SEQ ID NO: 121), SynB3 (SEQ ID NO: 122) и SynB4 (SEQ ID NO: 123); [83]) и фактор роста фибробластов Капоши (SEQ ID NO: 105; [84]). Было обнаружено, что другие белки и их пептидные производные обладают сходными свойствами интернализации клеток. Пептиды-носители, которые были получены из этих белков, демонстрируют небольшую гомологию последовательностей друг с другом, но все они являются высоко катионными и богатыми аргинином или лизином. Действительно, было показано, что синтетические полиаргининовые пептиды интернализуются с высоким уровнем эффективности и могут быть отобраны для конъюгации с предоставленным антителом [85 – 86]. PTD также может быть выбран из одного или более синтетических PTD, включая, но не ограничиваясь этим, транспортан (SEQ ID NO: 136; [87 – 88]), MAP (SEQ ID NO: 103; [89]), KALA (SEQ ID NO: 101; [90]) и другие катионные пептиды, такие как, например, различные β -катионные пептиды [91]. Дополнительные пептиды PTD и варианты PTD также представлены, например, в патентных публикациях США: US 2005/0260756, US 2006/0178297, US 2006/0100134, US 2006/0222657, US 2007/0161595, US 2007/0129305; в Европейском

патенте: EP 1867661; в международных патентных публикациях: WO 2000/062067, WO 2003/035892, WO 2007/097561, WO 2007/053512; и в Таблице 13 в данном документе (см. ниже). Любые такие РТD, представленные в данном документе или известные в данной области техники, могут быть конъюгированы с представленным терапевтическим антителом.

Таблица 13. Известные домены белковой трансдукции.

Домен белковой трансдукции (PTD)	Исходный белок	SEQ ID NO
TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	Буфорин II	82
RKKRRRESRKKRRRES	DPV3	83
GRPRESGKKRKRRLKP	DPV6	84
GKRKKKGKLGKKRDP	DPV7	85
GKRKKKGKLGKKRPRSR	DPV7b	86
RKKRRRESRRARRSPRHL	DPV3/10	87
SRARRSPRESGKKRKRKR	DPV10/6	88
VKRGLKLRHVRPRVTRMDV	DPV1047	89
VKRGLKLRHVRPRVTRDV	DPV1048	90
SRARRSPRHLGSG	DPV10	91
LRRERQSRLRRERQSR	DPV15	92
GAYDLRRERQSRLRRERQSR	DPV15b	93
WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAEALAA	GALA	94
KGSWYSMRKMSMKIRPFFPQQ	Бета-цепь фибриногена	95
KTRYYSMKKTTMKIIPFNRL	Предшественник гамма-цепи фибриногена	96
RGADYSLRAVRMKIRPLVTQ	Альфа-цепь фибриногена	97
LGTYTQDENKFHTFPQTAIGVGAP	hCT(9-32)	98
TSPLNIHNGQKL	HN-1	99
NSAAFEDLRVLS	Нуклеопротеин вируса гриппа (NLS)	100
WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA	KALA	101
VPMLKPMLKE	Ku70	102
KLALKLALKALKAAKLKLA	MAP	103
GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	MPG	104
AAVALLPAVLLALLAP	Фактор роста фибробластов человека 4 (фактор роста фибробластов Капоши)	105
VQRKRQKLM	N50 (NLS of NF- κ B P50)	106
KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	Рер-1	107
SDLWEMMMVSLACQY	Рер-7	108
RQIKIWFQNRRMKWKK	Пенетратин	109
GRQIKIWFQNRRMKWKK	Пенетратин вариант	110
RRMKWKK	Пенетратин укороченный	111

Домен белковой трансдукции (PTD)	Исходный белок	SEQ ID NO
ERQIKIWFQNRRMKWKK	Пенетратин 42-58	112
RRRRRRR	Полиаргинин - R7	113
RRRRRRRRR	Полиаргинин - R9	114
RVIRVWFQNKRCCKDKK	pISL	115
MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP	Прион мыши PrP ^{Sc} -28	116
LLIILRRRIRKQAHANHSK	pVEC	117
LLIILRRRIRKQAHAN	pVEC вариант	118
VRLPPPVRLPPPVRLPPP	SAP	119
PKKKRKV	SV-40 (NLS)	120
RGRLSYSRREFSTSTGR	SynB1	121
RRLSYSRREF	SynB3	122
AWSFRVSYRGISYRRSR	SynB4	123
YGRKKRRQRRRPPQ	Tat 47-60	124
YGRKKRRQRRR	Tat 47-57	
YGRKKRRQRR	Tat 47-56	126
GRKKRRQRR	Tat 48-56	127
GRKKRRQRRR	Tat 48-57	128
RKKRRQRRR	Tat 49-57	129
RKKRRQRR	Tat 49-56	130
GRKKRRQRRRPPQ	Tat 48-60	131
GRKKR	Tat 48-52	132
CFITKALGISYGRKKRRQRRRPPQFSQTHQVSLSKQ	Tat 37-72	133
FITKALGISYGRKKRRQRRRPPQFSQTHQVSLSKQ	Tat 38-72	134
YGRKKRRQRRRPP	Tat 47-59	135
GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	Транспортан	136
AGYLLGKINLKALAALAKKIL	Транспортан 10	137
GWTLNSAGYLLG	производное Транспортана	138
INLKALAALAKKIL	производное Транспортана	139
DAATATGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVD	VP22	140
DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKGDPKPD	VT5	141
GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	пептид на основе сигнальной последовательности	142
KLALKLALKALKAALKLA	амфифильный модельный пептид	143
KFFKFFKFFK	проникающий через бактериальную клеточную стенку	144
LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	LL- 37	145
SWLSKTAKKLENSAKKRISegIAIAIQGGPR	Цекропин P1	146
ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC	альфа-дефензин	147
DHYNCSVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTCYRGKAKCCK	бета-дефензин	148
RKCRIWIRVCR	Бактенецин	149
RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRF PGKR	PR- 39	150

Домен белковой трансдукции (PTD)	Исходный белок	SEQ ID NO
ILPWKWPWWPWRR	Индолицидин	151
GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	MPS	152
PVIRRVWFQNKRCCKDKK	pIsI	153

В некоторых примерах PTD могут быть модифицированы заменой лизина или аргинина другой основной аминокислотой, такой как замена лизина аргинином или замена аргинина лизином.

Д. АНАЛИЗЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ И/ИЛИ МОНИТОРИНГА АКТИВНОСТИ MTSP-1 В ОТНОШЕНИИ ФУНКЦИЙ, ОПОСРЕДОВАННЫХ КОМПЛЕМЕНТОМ

Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, проявляют измененную специфичность и/или селективность в отношении белка C3 комплемента. Типичные модифицированные полипептиды MTSP-1 специфически расщепляют белок C3 комплемента и тем самым изменяют активацию комплемента. Кроме того, типичные модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, могут иметь измененную или пониженную специфичность и/или селективность в отношении расщепления субстратов MTSP-1, таких как, например, активируемый протеиназой рецептор-2 (PAR-2), урокиназа активатор плазминогена (uPA) и/или фактор роста гепатоцитов (HGF).

Различные анализы *in vitro* и *in vivo* могут использоваться для мониторинга или скрининга полипептидов MTSP-1 на их способность расщеплять белок C3 комплемента и их влияние на активацию комплемента и опосредованные комплементом заболевания и расстройства. Такие анализы хорошо известны специалистам в данной области техники. Специалист в данной области техники может протестировать конкретный полипептид MTSP-1 на расщепление белка C3 комплемента и/или проверить его, чтобы оценить любое изменение в эффектах MTSP-1 на опосредованную комплементом активность по сравнению с таковой в отсутствие протеазы. Некоторые такие анализы приведены в настоящем документе в качестве примера.

В настоящем документе приведены примеры анализов *in vitro* и *in vivo* для сравнения активности модифицированного полипептида MTSP-1 в отношении функции белка C3 комплемента. Кроме того, специалистам в данной области известны многочисленные анализы, такие как анализы для измерения активации комплемента. Анализы активности комплемента включают, но не ограничиваются ими, анализы, которые измеряют продукты активации комплемента, такие как, например, МАК-комплекс C5b-9, и образование любого одного или нескольких продуктов расщепления комплемента, таких как C5a, C3b и C3d. Анализы для измерения активации комплемента также включают функциональные

анализы, которые измеряют функциональную активность конкретных компонентов путей комплемента, такие как, например, гемолитические анализы, используемые для измерения активации любого из классического, лектинового или альтернативного путей. Анализы для оценки влияния полипептидов MTSP-1 на белки комплемента и/или функции, опосредованные комплементом, включают, но не ограничиваются ими, анализ SDS-PAGE с последующим окрашиванием Вестерн-блоттингом или окрашиванием Кумасси бриллиантовым синим, иммуноферментными анализами и гемолитическими анализами. В одном примере анализы *in vitro* могут быть выполнены с использованием очищенного белка C3 комплемента, как показано в примере 2. В другом примере анализы *in vivo* могут проводиться путем тестирования сыворотки вида, включая виды млекопитающих или человека, на функциональную активацию комплемента, как показано в примерах 8 и 10. В другом примере анализы *in vitro* могут быть выполнены путем тестирования сыворотки вида, включая виды млекопитающих или человека, на функциональную активацию комплемента, как показано в примерах 4 – 6. В другом примере анализы *in vitro* могут быть выполнены с использованием пептидных библиотек, как показано в примерах 5 – 7. Различные модели заболеваний, известные специалисту в данной области, могут быть использованы для проверки эффективности полипептидов MTSP-1, представленных в настоящем документе, при различных опосредованных комплементом заболеваниях и расстройствах.

В настоящем документе также представлены иллюстративные анализы для определения активности модифицированных полипептидов MTSP-1 в отношении активностей MTSP-1 дикого типа, таких как расщепление активируемого протеиназой рецептора-2 (PAR-2), активатора плазминогена урокиназного типа (uPA), и/или фактора роста гепатоцитов (HGF). Также представлены анализы для определения специфичности модифицированных полипептидов MTSP-1 в отношении белка C3 комплемента.

Примерные анализы описаны ниже.

1. Методы оценки активности MTSP-1 и специфичности расщепления белка C3 комплемента для его инактивации

Модифицированная MTSP-1 протеаза может проявлять изменения в специфичности и/или селективности для инактивации C3 по сравнению с соответствующей полноразмерной протеазой дикого типа или протеазным доменом или соответствующей формой немодифицированной MTSP-1 протеазы (то есть полипептидов MTSP-1 с SEQ ID NO: 1–4). Модифицированные MTSP-1 протеазы, раскрытые в данном документе, могут сохранять протеазную активность, но проявлять повышенную специфичность и/или селективность или активность расщепления C3, тем самым препятствуя активации

комплемента. Все такие модифицированные протеазы MTSP-1 с повышенной специфичностью и/или селективностью к любому одному или нескольким из белков комплемента являются потенциальными терапевтическими средствами для лечения любого расстройства, в котором активация комплемента играет роль или вовлечена.

Если модифицированная протеаза MTSP-1 проявляет повышенную специфичность и/или селективность по отношению к любому одному или нескольким белкам комплемента, то можно использовать анализы *in vitro* и *in vivo* для мониторинга или скрининга протеаз на предмет воздействия на функции, опосредованные комплементом. Такие анализы хорошо известны специалистам в данной области. Специалист в данной области может протестировать модифицированную протеазу MTSP-1 на расщепление C3 и/или тестировать, чтобы оценить любое изменение в эффектах модифицированной MTSP-1 протеазы на опосредованную комплементом активность по сравнению с отсутствием модифицированной MTSP-1 протеазы. Некоторые такие анализы приведены в качестве примера в настоящем документе.

В настоящем документе приведены примеры анализов *in vitro* и *in vivo* для сравнения активности модифицированной MTSP-1 протеазы в отношении функции любого одного или более из целевых белков комплемента. Многие анализы применимы к другим протеазам и модифицированным протеазам. Кроме того, специалистам в данной области известны многочисленные анализы, такие как анализы для измерения активации комплемента. Анализы активности комплемента включают, но не ограничиваются ими, анализы, которые измеряют продукты активации, образующиеся при активации комплемента, такие как, например, МАК-комплекс C5b-9, и образование любого одного или более из продуктов расщепления комплемента, таких как C4a, C5a, C3b и C3d. Анализы для измерения активации комплемента также включают функциональные анализы, которые измеряют функциональную активность конкретных компонентов путей комплемента, такие как, например, гемолитические анализы, используемые для измерения активации любого из классического, лектинового или альтернативного путей. Анализы для оценки влияния протеаз и модифицированных протеаз на белки комплемента и/или функции, опосредованные комплементом, включают, но не ограничиваются ими, SDS-анализ с последующим окрашиванием Кумасси бриллиантовым синим или Вестерн-блоттингом, иммуноферментные анализы и гемолитические анализы. В одном примере анализы *in vitro* могут быть выполнены с использованием очищенных белков комплемента. В другом примере анализы *in vivo* могут быть выполнены путем тестирования сыворотки вида, включая виды млекопитающих или человека, на функциональную активацию комплемента. Примерные анализы описаны ниже.

а. Обнаружение белка

Обнаружение белка является средством измерения отдельных компонентов комплемента в образце. Белки комплемента могут быть обнаружены для непосредственной оценки влияния полипептида MTSP-1 на расщепление белка комплемента C3, или, альтернативно, белки комплемента могут быть измерены в качестве средства для оценки активации комплемента.

Белок C3 комплемента, обработанный в присутствии или в отсутствие полипептида MTSP-1, может быть проанализирован любым одним или несколькими анализами, включая SDS-PAGE с последующим окрашиванием Кумасси или Вестерн-блоттингом, иммуноферментный анализ, иммуногистохимию, проточную цитометрию, нефелометрию, диффузию агаровым гелем или радиальную иммунодиффузию.

Примерные анализы для определения белка описаны ниже.

i. SDS-PAGE Анализ

Анализ белков комплемента в присутствии или в отсутствие возрастающих концентраций полипептида MTSP-1 может быть выполнен путем анализа белков на SDS-PAGE с последующим обнаружением этих белков. В таких примерах белки комплемента могут быть обнаружены окрашиванием на общий белок, таким как окрашивание Кумасси бриллиантовым синим, серебряное окрашивание или любой другой из способов, известных специалисту в данной области техники, или Вестерн-блоттингом с использованием поликлональных или моноклональных антител, специфичных для указанного белка. Как правило, очищенный белок комплемента, такой как, например, белок C3 комплемента, можно инкубировать в присутствии или в отсутствие полипептида MTSP-1. Обработанный белок комплемента может быть разделен на SDS-PAGE геле с последующим обнаружением белка в геле, например, при помощи окрашивания Кумасси бриллиантовым синим. Обработанный белок можно сравнить с его родственным полноразмерным белком, а также можно определить продукты разложения, образованные расщеплением белка протеазой.

В другом варианте осуществления образец, такой как, например, человеческая сыворотка или плазма или грудное молоко, может обрабатываться в присутствии или в отсутствие полипептида MTSP-1 или может быть собран после лечения животного или человека с помощью полипептида MTSP-1 или без него. Образец, обработанный MTSP-1, можно проанализировать на SDS-PAGE, и затем обнаружить специфический белок комплемента, такой как, например, C3, C5 или фактор В, с помощью Вестерн-блоттинга с использованием моноклональных или поликлональных антител против белка. Расщепление белка комплемента можно сравнить с образцом, который не обрабатывали полипептидом

MTSP-1. Кроме того, образец можно стимулировать для инициирования активации комплемента, например, путем инкубации с IgG, который стимулирует активацию классического пути, или с помощью LPS, который стимулирует активацию альтернативного пути. Образец может быть разделен с помощью SDS-PAGE для обнаружения любого одного или нескольких нативных белков комплемента для определения наличия или отсутствия продуктов расщепления указанного белка по сравнению с образцом белка, не обработанным полипептидом MTSP-1. В таких примерах эффекторные молекулы расщепления нативных белков комплемента также можно анализировать с помощью Вестерн-блоттинга с использованием моноклональных и поликлональных антител для оценки активации одного или нескольких путей комплемента. Примеры эффекторных молекул комплемента могут включать, но не ограничиваются ими, C3a, C3d, iC3b, Bb и C5-b9. Например, пониженная экспрессия в образце Bb может указывать на то, что полипептид MTSP-1 ингибировал активацию альтернативного пути комплемента. Также могут быть определены продукты расщепления эффекторных молекул для оценки влияния возрастающих концентраций полипептида MTSP-1 на расщепление самих эффекторных молекул комплемента.

II. Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (ИФА; ELISA) – это анализ, используемый для измерения присутствия белка в образце. Как правило, измерение белка является косвенным измерением связывания белка с антителом, которое само химически помечено детектируемым субстратом, таким как фермент или флуоресцентное соединение. Анализы EIA могут быть использованы для измерения влияния полипептидов MTSP-1 на активацию комплемента путем измерения присутствия эффекторной молекулы комплемента, генерируемой после активации комплемента. В таких примерах образец, такой как, например, человеческая сыворотка или плазма, может быть предварительно обработан в присутствии или в отсутствие увеличивающихся концентраций полипептида MTSP-1 и впоследствии активирован для индукции активации комплемента путем инкубации с иницирующими молекулами или может быть собран после обработки животного или человека полипептидом MTSP-1. Например, классический путь может быть активирован путем инкубации с IgG, а альтернативный путь может быть активирован путем инкубации образца с LPS. Анализ активации комплемента, специфичный для лектинового пути, требует, чтобы классический путь комплемента был ингибирован, поскольку активность расщепления C4/C2 лектинового пути является общей с классическим путем комплемента. Ингибирование классического пути может быть достигнуто с использованием буфера с высокой ионной силой, который ингибирует связывание C1q с иммунными комплексами и

разрушает комплекс C1, тогда как буфер с высокой ионной силой не влияет на активность связывания углеводов MBL. Следовательно, активация лектинового пути может быть индуцирована путем инкубации образца, такого как человеческая сыворотка или плазма, с покрытой маннаном поверхностью в присутствии 1 M NaCl.

После активации образец может быть погашен добавлением Pefabloc (Roche) и EDTA, чтобы минимизировать продолжающуюся активацию путей.

Образцы можно анализировать на присутствие эффекторных молекул комплемента с помощью анализа EIA или ELISA. Анализы EIA и ELISA для измерения белков комплемента хорошо известны специалисту в данной области. Таким образом можно оценить любой продукт активации комплемента. Типичные продукты активации комплемента для измерения активации комплемента включают iC3b, Bb, C5b-9, C3a, C3a-desArg и C5a-desArg. Активированный путь комплемента может быть определен в зависимости от измеренного продукта активации комплемента. Например, измерение продукта расщепления Bb является уникальным маркером альтернативного пути.

В некоторых примерах EIA может сочетаться с детектированием расщепленных белков комплемента путем анализа обработанного протеазой образца, стимулированного комплементом, с помощью SDS-PAGE с последующим Вестерн-блоттинг анализом для идентификации специфических компонентов комплемента. Используя программное обеспечение для денситометрии, расщепление продукта комплемента можно сравнить с полноразмерным компонентом комплемента, расщепленным на протяжении анализа, и определить появление всех основных продуктов разложения и процент расщепления.

III. Радиальная иммунодиффузия (РИД)

Радиальная иммунодиффузия (RID; РИД) – это метод, который основан на осаждении иммунных комплексов, образованных между антителами, включенными в агарозные гели, когда их разливают, и присутствием антигена в тестируемом образце, что приводит к образованию круглой линии преципитации вокруг лунки образца. Диаметр преципитинового кольца пропорционален концентрации антитела (или антигена), присутствующего в тестируемом образце. Сравнивая диаметр преципитинового кольца тестируемого образца с известными стандартами, можно получить относительно нечувствительную оценку концентрации специфического антитела или антигена. РИД может быть использован для измерения количества белка комплемента в образце. Например, образец, такой как, например, человеческая сыворотка или плазма, может быть обработан в присутствии или в отсутствие увеличивающихся концентраций полипептида MTSP-1. Образец, обработанный протеазой, может быть добавлен в лунку агарозного геля, который был сделан для включения поликлонального или моноклонального антитела,

против любого одного из белков комплемента, таких как, без ограничения, C3, C5, C6, C7, C9 или Фактор В. После удаления неосажденных белков путем воздействия 0,15 М NaCl, осажденные белковые кольца можно оценить путем окрашивания белковым красителем, таким как, например, Кумасси бриллиантовый синий или двойное окрашивание Кроулз.

б. Гемолитические тесты

Функциональные гемолитические анализы дают информацию о функции комплемента в целом. В этом типе анализа используются сенсibilизированные антителами или несенсibilизированные эритроциты овцы. Гемолитические анализы включают анализ общего гемолитического комплемента (CH_{50}), который измеряет способность классического пути и МАК лизировать RBC овцы. Лизирование эритроцитов овцы, которые были сенсibilизированы оптимальным количеством антител кролика к эритроцитам овцы для образования клеточных комплексов антиген–антитело, зависит от последовательной активации компонентов классического пути (C1–C9). Гемолитические анализы также могут включать анализ CH_{50} альтернативного пути (CH_{50} или $APCH_{50}$ кролика), который измеряет способность альтернативного пути и МАК лизировать RBC кролика. Одна единица CH_{50} и/или $APCH_{50}$ определяется как количество или разведение сыворотки, необходимое для лизиса 50% эритроцитов в тесте. Как правило, для оценки активации комплемента образец, такой как, например, человеческая сыворотка или человеческая плазма, может быть обработан в присутствии или в отсутствие увеличивающихся концентраций полипептида MTSP–1 или может быть собран после обработки животного или человека в присутствии или в отсутствие полипептида MTSP–1. Образец, обработанный протеазой, может быть впоследствии смешан с эритроцитами овцы, активированными или сенсibilизированными с помощью IgG. Только водные образцы, смешанные с эритроцитами овцы, могут действовать как полный контроль лизиса, для точной оценки процента лизиса анализируемых образцов. Добавление 0,15 М NaCl к образцу может быть использовано, чтобы остановить реакцию лизиса. Лизис эритроцитов, вызванный активацией терминальных компонентов пути комплемента, может быть оценен путем измерения высвобождения гемоглобина. Измерение может проводиться по показаниям оптической плотности (OD) образцов с использованием спектрофотометра при длине волны 415 нм.

В одном варианте осуществления гемолитические анализы с ограниченным разведением можно использовать для измерения функциональной активности конкретных компонентов любого пути. В таком анализе используется источник сыворотки, который имеет избыток всех компонентов комплемента, но недостаточен для измеряемого в образце, то есть среда или источник сыворотки истощаются комплементом для конкретного белка. Поэтому степень гемолиза зависит от присутствия измеряемого компонента в исследуемом

образце. В таком анализе очищенный белок комплемента, такой как, например, любой из природных белков комплемента, включая, но не ограничиваясь им, C3, можно инкубировать в присутствии или в отсутствии возрастающих концентраций полипептида MTSP-1. Обработанный протеазой очищенный белок комплемента может быть в последствии смешан с обедненной комплементом средой или плазмой и активированными IgG эритроцитами овцы, с последующей оценкой гемолиза образца, как описано выше. В другом варианте осуществления расщепление протеазой может коррелировать с активацией комплемента путем анализа гемолитической активности образца, обработанного протеазой, и последующего анализа образца на SDS-PAGE геле с последующим окрашиванием белковым красителем, таким как, например, Кумасси синий. Для очищенного белка комплемента, обработанного протеазами, может проводиться оценка расщепления и расчет процентного содержания полноразмерного компонента комплемента, расщепленного на протяжении анализа, с последующим вычислением присутствия в образце всех основных продуктов разложения. Альтернативно, анализ обработанного протеазой белка комплемента, может быть выполнен Вестерн-блоттингом.

Альтернатива гемолитическому анализу, называемая липосомным иммуноанализом (LIA), может быть использована для оценки активации классического пути. В LIA (Wako Chemicals USA, Ричмонд, Вирджиния) используются липосомы, покрытые динитрофенилом (DNP), которые содержат фермент глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу. Когда сыворотка смешивается с липосомами и субстратом, содержащим антитело против DNP, глюкозо-6-фосфат и никотинамидадениндинуклеотид, активированные липосомы лизируются и происходит ферментативная колориметрическая реакция, которая пропорциональна общей активности классического пути комплемента.

с. Методы определения сайтов расщепления

Последовательности расщепления в белке C3 комплемента могут быть идентифицированы любым способом, известным в данной области (см., например, патентную публикацию США: US 2004/0146938). В одном примере последовательность расщепления определяют инкубацией белка C3 комплемента с любым модифицированным полипептидом MTSP-1, представленным в данном документе. После инкубации с полипептидом MTSP-1, белок C3 можно отделить с помощью SDS-PAGE, а и идентифицировать продукты разложения при помощи окрашивания белковым красителем, таким как Кумасси бриллиантовый синий. Протеолитические фрагменты могут быть секвенированы для определения идентичности последовательностей расщепления. После идентификации флуорогенные пептидные субстраты, сконструированные на основе

последовательности расщепления желаемого целевого субстрата, можно использовать для оценки активности, как описано ниже.

2. Методы оценки активности MTSP-1 дикого типа

Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, могут иметь измененную или пониженную специфичность к их нормальным субстратам, таким как, например, активируемый протеиназой рецептор-2 (PAR-2), активатор плазминогена урокиназного типа (uPA) и/или фактор роста гепатоцитов (HGF). Модифицированные полипептиды MTSP-1 могут быть проверены с целью определения того, сохраняют ли они каталитическую эффективность и/или субстратную специфичность для своего нативного субстрата. Например, расщепление PAR-2 можно оценить инкубацией полипептида MTSP-1 с PAR-2 и обнаружением продуктов расщепления белка. В другом примере расщепление PAR-2 может быть определено *in vitro* путем измерения расщепления флуорогенно меченного тетрапептида пептидного субстрата, например флуорогенного субстрата, такого как флуорофоры ACC (7-амино-4-карбамоил-метилкумарин) – или AMC-(7-амино-4-метилкумарин), связанного с тетрапептидом. В некоторых примерах анализы активации PAR-2 используются для определения специфичности полипептидов MTSP-1, представленных в настоящем документе.

В другом примере расщепление C3 можно оценивать путем инкубации полипептида MTSP-1 с C3 и обнаружения продуктов расщепления белка. В другом примере расщепление C3 может быть определено *in vitro* путем измерения расщепления флуорогенно меченного тетрапептида пептидного субстрата, например, ACC– или AMC–тетрапептида. В некоторых примерах анализы активации C3 используют для определения специфичности модифицированных полипептидов MTSP-1, представленных в настоящем документе. В другом примере оценивали расщепление HGF путем инкубации модифицированного полипептида MTSP-1 с HGF и обнаружения продуктов расщепления белка. В другом примере расщепление HGF может быть определено *in vitro* путем измерения расщепления флуорогенически меченного тетрапептида пептидного субстрата, например, ACC– или AMC–тетрапептида. В некоторых примерах анализы активации HGF используют для определения специфичности полипептидов MTSP-1, представленных в настоящем документе. В других примерах определяют способность полипептидов MTSP-1, представленных в настоящем документе, образовывать комплекс с ингибитором сериновой протеазы типа Kunitz, ингибитором активатора фактора роста гепатоцитов-1 (HAI-1).

а. Расщепление субстратов MTSP-1

В одном примере модифицированные полипептиды MTSP-1 можно анализировать с использованием индивидуальных флуорогенных пептидных субстратов, соответствующих желаемой последовательности расщепления. Например, способ анализа модифицированной протеазы MTSP-1, которая может расщеплять любую одну или более из желаемых последовательностей расщепления, включает: (а) контактирование пептидного флуорогенного образца (содержащего желаемую целевую последовательность расщепления) с протеазой таким образом, что флуорогенный фрагмент высвобождается из последовательности пептидного субстрата под действием протеазы, в результате чего образуется флуоресцентный фрагмент; и (б) наблюдение за изменением флуоресценции в образце, где обнаруженное изменение флуоресценции является показателем присутствия ферментативно активной протеазы в образце. В таком примере целевая последовательность расщепления превращается во флуорогенный пептид способами, известными в данной области. В одном варианте осуществления отдельные последовательности расщепления пептида могут быть присоединены к флуорогенно меченому субстрату, такому как, например, флуорогенная уходящая группа АСС или АМС, где последующее определение высвобождения флуорогенного фрагмента является мерой специфичности протеазы для последовательности расщепления пептида. Скорость увеличения флуоресценции целевой последовательности расщепления может быть измерена, например, с использованием флуоресцентного спектрофотометра. Скорость увеличения флуоресценции можно измерять во времени. Кинетические константы Михаэлиса–Ментона могут быть определены стандартными кинетическими методами. Кинетические константы k_{cat} , K_m и k_{cat}/K_m можно рассчитать путем построения графика зависимости обратной концентрации субстрата от обратной скорости расщепления субстрата и подгонки к уравнению Линевера–Бёрка ($1/\text{скорость} = (K_m/V_{max})(1/[S]) + 1/V_{max}$; где $V_{max} = [ET] k_{cat}$). Константа скорости второго порядка или константа специфичности (k_{cat}/K_m) является мерой того, насколько хорошо субстрат расщепляется конкретной протеазой. Например, АСС– или АМС–тетрапептид, такой как Ас–CPGR–АМС или может быть изготовлен и инкубирован с модифицированным полипептидом MTSP-1, представленным в настоящем документе, с последующей оценкой активности полипептида MTSP-1 путем анализа на высвобождение флуорогенного фрагмента. Выбор тетрапептида зависит от целевой последовательности расщепления, которую необходимо проанализировать, и может быть определен эмпирически.

В других вариантах осуществления полипептиды MTSP-1 также можно анализировать, чтобы удостовериться, что они будут расщеплять целевую

последовательность, когда они представлены в контексте полноразмерного белка. В одном примере очищенный белок-мишень, т.е. PAR-2, uPA или HGF, можно инкубировать в присутствии или в отсутствие выбранного полипептида MTSP-1, а событие расщепления отслеживать с помощью SDS-PAGE с последующим окрашиванием Кумасси бриллиантовым синим и анализировать продукты расщепления с помощью денситометрии.

б. Анализы связывания MTSP-1 с субстратом

Связывание полипептидов MTSP-1 с субстратом MTSP-1 для выявления белок-белковых взаимодействий может быть оценено любым анализом, известным специалисту в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, твердофазное связывание, ELISA, поверхностный плазмонный резонанс и FACS. В одном примере может быть использован ELISA. Рекомбинантный белок субстрата иммобилизуют на планшете для микротитрования, и измеряют связывание полипептида MTSP-1 путем добавления реагента, который специфически связывается с MTSP-1, такого как, например, антитело, связывающее MTSP-1. В другом примере для оценки связывания может быть использован анализ на основе клеток, с использованием клеточной линии, которая экспрессирует субстрат. Полипептиды MTSP-1 могут быть мечеными, например, хромогенным, флуорогенным или радиоактивным субстратом для детекции связывания с субстратом.

с. C3 Анализы расщепления

Активность модифицированных полипептидов MTSP-1 в отношении расщепления субстрата – белка C3 комплемента человека можно оценивать путем измерения количества интактного человеческого C3, оставшегося после инкубации с различными концентрациями модифицированной протеазы MTSP-1. В соответствии с этим анализом сигнал генерируется в присутствии интактного человеческого C3 и теряется при расщеплении C3.

Очищенный белок C3 может быть инкубирован с модифицированными полипептидами MTSP-1, а остаточные уровни нерасщепленного человеческого C3 могут быть определены количественно при помощи любого анализа, известного в данной области техники для оценки концентрации белка, таким как, например, гомогенный анализ усиленной за счёт эффекта близости люминесценции (AlphaScreen; Перкин Элмер). Смесь полипептидов C3/MTSP-1 инкубируют с акцепторными гранулами, покрытыми IgG мыши, и после инкубации смесь mAb/акцепторных гранул α -hC3 инкубируют с биотинилированным pAb α -hC3. К смеси добавляют донорные шарики, покрытые стрептавидином, и измеряют сигнал «альфаскрин» (возбуждение = 680 нм, излучение = 570 нм). Этот сигнал соответствует концентрации оставшегося белка C3. Можно рассчитать

концентрацию полипептида MTSP-1, необходимую для расщепления через 50% доступного hC3 (EC_{50}).

3. Специфичность

Константу специфичности расщепления модифицированным полипептидом MTSP-1 целевого субстрата, например, белка комплемента C3 или субстрата MTSP-1, такого как, например, PAR-2, uPA или HGF, можно определить с помощью гель-денситометрии, оценивая изменения с течением времени в отношении целевого субстрата полной длины, инкубированного в присутствии полипептида MTSP-1. В конкретных вариантах осуществления сравнение специфичности модифицированного полипептида MTSP-1 можно использовать, чтобы определить, проявляет ли модифицированный полипептид MTSP-1 изменения в специфичности, например, повышенную специфичность к C3 по сравнению с полипептидом дикого типа или эталонным полипептидом MTSP-1. Специфичность полипептида MTSP-1 для целевого субстрата, например, белка C3 комплемента, может быть определена по константе специфичности расщепления целевого субстрата полипептидом MTSP-1 по сравнению с константой специфичности для нецелевого субстрата (например, нативного субстрата MTSP-1 дикого типа). Соотношение констант специфичности модифицированного полипептида MTSP-1 для целевого субстрата C3 и нецелевого субстрата, такого как, например, PAR-2, uPA или HGF, может быть использовано для определения коэффициента эффективности расщепления модифицированного полипептида MTSP-1. Сравнение соотношения эффективности расщепления между модифицированным полипептидом MTSP-1 и полипептидом MTSP-1 дикого типа или эталонным полипептидом можно использовать для оценки кратного изменения специфичности по отношению к целевому субстрату. Специфичность может быть, по меньшей мере, в 2 раза, по меньшей мере, в 4 раза, по меньшей мере, в 5 раз, по меньшей мере, в 6 раз, по меньшей мере, в 7 раз, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70. В 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 раз или более увеличенной специфичностью полипептида MTSP-1 дикого типа к целевому субстрату по сравнению с таковой для нецелевого субстрата.

Кинетический анализ расщепления нативных субстратов полипептидом MTSP-1 можно сравнить с анализом расщепления желаемых целевых субстратов в белке C3 комплемента для оценки специфичности модифицированного полипептида MTSP-1 по отношению к белку C3 комплемента. Кроме того, можно оценивать константы скорости ингибирования второго порядка (k_z) для мониторинга эффективности и реакционной способности модифицированного полипептида MTSP-1 в отношении белка C3 комплемента. Для целей настоящего изобретения, модифицированные полипептиды

MTSP-1 расщепляют C3, так что активация комплемента ингибируется, и, как показано в примерах, они делают это со значительно большей активностью, такой как по меньшей мере, в 5 раз большей активностью, чем немодифицированный полипептид MTSP-1 (или модифицированный полипептид MTSP-1 с заменой C122S, который удаляет свободный цистеин, тем самым уменьшая агрегацию).

Например, модифицированный полипептид MTSP-1 с SEQ ID NO: 35 расщепляет C3 человека со значением ED₅₀ 2 нМ по сравнению со значением 11 нМ для домена протеазы дикого типа SEQ ID NO: 4 (метод анализа описан ранее).

4. Модели заболеваний

Модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, можно использовать в любой клинически значимой модели заболевания, известной специалисту в данной области, для определения их влияния на опосредованные комплементом заболевания или расстройства. Типичные анализы включают, но не ограничиваются ими, анализы для трансплантации, включая анализы *in vitro* с островковыми клетками человека [92] и анализы *ex vivo* с почками свиньи [93]; на биосовместимость, включая искусственное поверхностное воспаление *in vitro* [94 – 97]; на воспаление, включая воспаление, вызванное кишечной палочкой *in vitro* [98] и воспаление, вызванное комплексом гепарин/протамин у бабуинов [99]; возрастную дегенерацию желтого пятна (возрастную макулярную дегенерацию) у кроликов, обезьян и грызунов [100–103]; и отсроченную функцию трансплантата у свиней [104] и собак [105].

Е. СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, КОДИРУЮЩИХ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ MTSP-1

Полипептиды модифицированного полипептида MTSP-1, представленного в настоящем документе, могут быть получены способами, хорошо известными в данной области техники для очистки белка и экспрессии рекомбинантного белка. Полипептиды также могут быть синтезированы химически. Модифицированные формы или варианты, включая усеченные формы, могут быть сконструированы из полипептида дикого типа с использованием стандартных методов рекомбинантных ДНК. Например, модифицированные полипептиды MTSP-1 могут быть сконструированы из полипептида дикого типа, с помощью сайт-направленного мутагенеза.

1. Выделение или получение нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды MTSP-1.

Полипептиды могут быть клонированы или выделены с использованием любых доступных методов для клонирования и выделения молекул нуклеиновой кислоты, известных в данной области техники. Такие методы включают ПЦР амплификацию

нуклеиновых кислот и скрининг библиотек, включая скрининг гибридизацией нуклеиновых кислот, скрининг на основе антител и скрининг на основе активности. Например, когда полипептиды получают рекомбинантными способами, можно использовать любой метод, известный специалистам в данной области техники, для идентификации нуклеиновых кислот, кодирующих желаемые гены. Для получения полноразмерной (то есть охватывающей всю кодирующую область) или частичной кДНК или клона геномной ДНК, кодирующей MTSP-1, например, из источника клеток или ткани, может быть использован любой метод, доступный в данной области техники.

Для выделения молекул нуклеиновых кислот, кодирующих желаемый полипептид, можно использовать методы амплификации нуклеиновых кислот, включая, например, методы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Примеры таких методов включают использование термоциклера (амплификатора) Perkin-Elmer Cetus и полимеразы Taq (Gene Amp). Материал, содержащий нуклеиновую кислоту, может быть использован в качестве исходного материала, из которого может быть выделена желаемая молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид. Например, в методах амплификации могут использоваться препараты ДНК и мРНК, клеточные экстракты, экстракты тканей, образцы жидкости (например, крови, сыворотки, слюны, грудного молока), образцы от здоровых и/или больных субъектов. Источником исходного материала могут быть любые виды эукариот, включая, но не ограничиваясь ими, позвоночных, млекопитающих, человека, свиней, коров, кошек, птиц, лошадей, собак и других приматов. Библиотеки нуклеиновых кислот также могут быть использованы в качестве источника исходного материала. Для амплификации желаемого полипептида могут быть сконструированы праймеры. Например, праймеры могут быть сконструированы на основе экспрессированных последовательностей, из которых генерируется желаемый полипептид. Праймеры могут быть сконструированы на основе обратной трансляции полипептидной аминокислотной последовательности. При желании, для амплификации можно использовать вырожденные праймеры. Олигонуклеотидные праймеры, которые гибридизуются с последовательностями на 3' и 5' концах желаемой последовательности, можно использовать в качестве праймеров для амплификации последовательностей из образца нуклеиновой кислоты при помощи ПЦР. Праймеры можно использовать для амплификации всего полноразмерного MTSP-1 или его усеченной последовательности, такой как нуклеиновая кислота, кодирующая любой из растворимых полипептидов MTSP-1, представленных в настоящем документе. Молекулы нуклеиновой кислоты, полученные амплификацией, могут быть секвенированы для подтверждения того, что они кодируют желаемый полипептид.

К молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, могут быть присоединены дополнительные нуклеотидные последовательности, включая линкерные последовательности, содержащие сайты эндонуклеазной рестрикции, с целью клонирования синтетического гена в вектор, например, вектор экспрессии белка или вектор, предназначенный для амплификации последовательности ДНК, кодирующей основной белок. Кроме того, дополнительные нуклеотидные последовательности, определяющие функциональные элементы ДНК, могут быть функционально связаны с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Примеры таких последовательностей включают, но не ограничиваются ими, промоторные последовательности, предназначенные для облегчения экспрессии внутриклеточного белка, и последовательности секреции, например гетерологичные сигнальные последовательности, предназначенные для облегчения секреции белка. Такие последовательности известны специалистам в данной области. С молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими фермент, также могут быть связаны дополнительные последовательности нуклеотидных остатков, такие как последовательности оснований, определяющих области связывания белка. Такие последовательности включают, но не ограничиваются ими, последовательности промоторов, предназначенные для облегчения внутриклеточной экспрессии белка, и последовательности секреции, например, гетерологичные сигнальные последовательности, предназначенные для облегчения секреции белка.

Кроме того, могут быть добавлены метки или другие фрагменты, например, для облегчения обнаружения или аффинной очистки полипептида. Например, с молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими фермент, также могут быть связаны дополнительные последовательности нуклеотидных остатков, такие как последовательности оснований, определяющих метку эпитопа или другой обнаруживаемый маркер. Примеры таких последовательностей включают последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие метку SUMO или His-метку или метку Flag-Tag.

Затем идентифицированные и выделенные нуклеиновые кислоты могут быть вставлены в соответствующий клонирующий вектор. Можно использовать большое количество систем вектор-хозяин, известных в данной области. Возможные векторы включают, но не ограничиваются ими, плазмиды или модифицированные вирусы, но векторная система должна быть совместима с используемой клеткой-хозяином. Такие векторы включают, но не ограничиваются ими, бактериофаги, такие как производные лямбды, или плазмиды, такие как производные плазмиды pCMV4, pBR322 или pUC, или вектор Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA). Вставка в вектор клонирования может быть осуществлена, например, путем лигирования фрагмента ДНК в вектор клонирования,

который имеет комплементарные когезионные концы. Вставка может быть осуществлена с использованием векторов клонирования TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Если комплементарные сайты рестрикции, используемые для фрагментации ДНК, отсутствуют в клонирующем векторе, то концы молекул ДНК могут быть ферментативно модифицированы. Альтернативно, любой желаемый сайт может быть получен путем лигирования нуклеотидных последовательностей (линкеров) с концами ДНК; такие лигированные линкеры могут содержать специфические химически синтезированные олигонуклеотиды, кодирующие последовательности распознавания эндонуклеазы рестрикции. В альтернативном способе расщепленный вектор и ген белка могут быть модифицированы гомополимерным хвостом.

Рекомбинантные молекулы могут быть введены в клетки-хозяева посредством, например, трансформации, трансфекции, инфекции, электропорации и сонопорации так, что генерируется много копий последовательности гена. В конкретных вариантах осуществления трансформация клеток-хозяев молекулами рекомбинантной ДНК, которые включают в себя выделенный ген белка, кДНК или синтезированную последовательность ДНК, позволяет генерировать множественные копии гена. Таким образом, ген может быть получен в больших количествах путем выращивания трансформантов, выделения молекул рекомбинантной ДНК из трансформантов и, при необходимости, извлечения вставленного гена из выделенной рекомбинантной ДНК.

В дополнение к рекомбинантной продукции, модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, могут быть получены прямым пептидным синтезом с использованием твердофазных методов [106 – 107]. Синтез белка *in vitro* может быть выполнен с использованием ручных методов или автоматических. Автоматический синтез может быть достигнут, например, при использовании синтезатора пептидов 431 A Applied Biosystems (Perkin Elmer, Foster City CA) в соответствии с инструкциями, предоставленными производителем. Различные фрагменты полипептида могут быть химически синтезированы отдельно и объединены с использованием химических методов.

2. Генерация мутантных или модифицированных нуклеиновых кислот и кодирование

Полипептиды

Представленные здесь модификации могут быть выполнены с помощью стандартных методов рекомбинантной ДНК, таких как рутинные для специалиста в данной области техники. Для осуществления мутации любой одной или более из аминокислот в целевом белке может быть использован любой метод, известный в данной области техники. Такие методы включают стандартный сайт-направленный мутагенез (с использованием,

например, набора, такого как QuikChange, доступный от Stratagene) кодирующих молекул нуклеиновой кислоты, или методы твердофазного синтеза полипептидов.

3. Векторы и клетки

Для рекомбинантной экспрессии одного или нескольких желаемых белков, таких как любой модифицированный полипептид MTSP-1, представленный в настоящем документе, нуклеиновая кислота, содержащая всю нуклеотидную последовательность или часть нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, может быть вставлена в соответствующий вектор экспрессии, т.е. вектор, содержащий необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей белок последовательности. Необходимые транскрипционные и трансляционные сигналы также могут подаваться нативным промотором для генов фермента и/или их фланкирующих областей.

Также, в данном документе раскрыты векторы, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую фермент, и клетки, содержащие такие векторы. Клетки включают эукариотические и прокариотические клетки, и векторы представляют собой любые подходящие для использования в них векторы. Обычно клетка представляет собой клетку, которая способна осуществлять гликозилирование кодируемого белка.

В данном документе раскрыты прокариотические и эукариотические клетки, содержащие векторы. Такие клетки включают бактериальные клетки, клетки дрожжей, клетки грибов, клетки архей, клетки растений, клетки насекомых и клетки животных. Клетки используют для продуцирования в них белка путем выращивания вышеописанных клеток в условиях, при которых кодируемый белок экспрессируется клеткой, и выделения экспрессированного белка. Например, для целей настоящего изобретения фермент может секретироваться в среде.

Штамм клетки-хозяина может быть выбран за его способность модулировать экспрессию встроенных последовательностей или обрабатывать экспрессированный белок желаемым способом. Такие модификации полипептида включают, но не ограничиваются ими, ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидирование и ацилирование. Посттрансляционная обработка может влиять на фолдинг (сворачивание) и/или функцию полипептида. Различные клетки-хозяева, например, без ограничения, клетки CHO (DG44, DXB11, CHO-K1), HeLa, MCDK, 293 и WI38, имеют специфические клеточные механизмы и характерные механизмы для таких посттрансляционных активностей и могут быть выбраны для обеспечения правильной модификации и обработки (процессинга) внесенного белка. Обычно, выбирается клетка, способная осуществлять N-связанное гликозилирование в экспрессируемом полипептиде. Следовательно, предоставляются эукариотические клетки, содержащие векторы.

Примерами эукариотических клеток являются клетки яичника китайского хомячка (CHO) млекопитающих. Например, клетки CHO, дефицитные по дигидрофолатредуктазе (например, клетки DG44), используются для продуцирования полипептидов, представленных в настоящем документе.

В настоящем документе представляются векторы, которые содержат последовательность нуклеотидов, кодирующую модифицированный полипептид MTSP-1, такой как модифицированный протеазный домен MTSP-1, связанный с нативной или гетерологичной сигнальной последовательностью, а также с их многочисленными копиями. Векторы могут быть выбраны для экспрессии ферментативного белка в клетке или так, чтобы ферментативный белок экспрессировался в виде секретируемого белка.

В одном варианте осуществления представлены векторы, содержащие последовательность нуклеотидов, которая кодирует полипептид, обладающий протеазной активностью и содержащий весь протеазный домен или часть протеазного домена, или их множественные копии. Также представлены векторы, которые содержат последовательность нуклеотидов, которая кодирует протеазный домен и дополнительные части протеазного белка, вплоть до включения полноразмерного протеазного белка, а также их многочисленных копий. Векторы могут быть выбраны для экспрессии каркасного или модифицированного протеазного белка или его протеазного домена в клетке или так, чтобы протеазный белок экспрессировался в виде секретируемого белка. Во время экспрессии домена протеазы (протеазного домена), нуклеиновая кислота связывается с нуклеиновой кислотой, кодирующей сигнал секреции, такой как сигнальная последовательность α -фактора спаривания *Saccharomyces cerevisiae* или ее часть, или нативная сигнальная последовательность.

Для экспрессии кодирующей белок последовательности могут быть использованы разнообразные системы вектор-хозяин. Такие системы включают, но не ограничиваются ими, клеточные системы млекопитающих, инфицированные вирусом (например, вирусом коровьей оспы, аденовирусом и другими вирусами); системы клеток насекомых, инфицированные вирусом (например, бакуловирусом); микроорганизмы, такие как дрожжи, содержащие дрожжевые векторы; или бактерии, трансформированные бактериофагом, ДНК, плазмидной ДНК или космидной ДНК. Элементы экспрессии векторов различаются по своим сильным сторонам и особенностям.

В зависимости от используемой системы вектор-хозяин может использоваться любой из множества подходящих элементов транскрипции и трансляции.

Для конструирования векторов экспрессии, содержащих химерный ген, который сожержит соответствующие сигналы контроля транскрипции/трансляции и

последовательности, кодирующие белок, могут быть использованы любые методы для вставки фрагментов ДНК в вектор, известные специалистам в данной области техники. Эти методы могут включать *in vitro* рекомбинантные ДНК и синтетические методы, а также *in vivo* рекомбинантные (генетическая рекомбинация). Экспрессия последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих белок или домены, производные, фрагменты или их гомологи, может регулироваться второй последовательностью нуклеиновой кислоты, так что гены или их фрагменты экспрессируются в клетке-хозяине, трансформированном молекулой(ами) рекомбинантной ДНК. Например, экспрессия белков может контролироваться любым промотором/энхансером, известным в данной области техники. В конкретном варианте осуществления промотор не является нативным для генов желаемого белка. Промоторы, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, ранний промотор SV40 [108], промотор, содержащийся в 3'-длинном концевом повторе вируса саркомы Рауса [109], промотор тимидинкиназы герпеса [110], регуляторные последовательности гена металлотионеина [111]; прокариотические экспрессирующие векторы, такие как β -лактамазный промотор [112] или *tac*-промотор [113]; (см. также [114]); векторы экспрессии растений, содержащие промотор нопалин-синтетазы [115] или промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты [116], и промотор фотосинтетического фермента рибулозобисфосфаткарбоксилазы [117]; промоторные элементы из дрожжей и других грибов, такие как промотор Gal4, промотор алкогольдегидрогеназы, промотор фосфоглицеролкиназы, промотор щелочной фосфатазы и следующие области контроля транскрипции животных, которые проявляют тканевую специфичность и используются у трансгенных животных: контрольная область гена эластазы I, которая активна в ацинарных клетках поджелудочной железы [118 – 120]; контрольная область гена инсулина, которая активна в бета-клетках поджелудочной железы [121], контрольная область гена иммуноглобулина, которая активна в лимфоидных клетках [122 – 124], контрольная область вируса опухоли молочной железы мыши, которая активна в яйчке, молочной железе, лимфоидном теле и тучных клетках [125], контрольная область гена альбумина, которая активна в печени [126], контрольная область гена альфа-фетопroteина, которая активна в печени [127 – 128], контрольная область гена альфа-1-антитрипсина, которая активна в печени [129], контрольная область гена бета-глобина, которая активна в миелоидных клетках [130 – 131], контрольная область гена основного белка миелина, которая активна в клетках олигодендроцитов головного мозга [132], контрольная область гена легкой цепи миозина-2, которая активна в скелетных мышцах [133], и контрольная область гена гонадотропного релизинг-гормона, которая активна в гонадотрофах гипоталамуса [134].

В конкретном варианте осуществления используется вектор, который содержит промотор, функционально связанный с нуклеиновыми кислотами, кодирующими желаемый белок, или его домен, фрагмент, производное или гомолог, один или несколько источников репликации и, необязательно, один или несколько селектируемых маркеров (например, ген устойчивости к антибиотикам). В зависимости от системы экспрессии, для эффективной трансляции последовательности MTSP-1 также требуются специфические факторы инициирования. Такие сигналы включают иницирующий кодон ATG и смежные последовательности. В тех случаях, когда иницирующий кодон и последующие последовательности MTSP-1 или его каталитически активные фрагменты вставлены в соответствующий вектор экспрессии, никаких дополнительных факторов трансляционного контроля не требуется. В случаях, когда вставлена только кодирующая последовательность или ее часть, должны быть предоставлены экзогенные факторы контроля транскрипции, включая иницирующий кодон ATG. Кроме того, кодон инициации должен находиться в правильной рамке считывания, чтобы обеспечить транскрипцию всей вставки. Экзогенные факторы транскрипции и иницирующие кодоны могут быть различного происхождения, как природного, так и синтетического. Эффективность экспрессии может быть повышена путем включения энхансеров, подходящих для используемой клеточной системы [135 – 136].

Типичные плазмидные векторы для трансформации клеток *E.coli* включают, например, векторы экспрессии pQE (доступны от Qiagen, Valencia, CA; см. также литературу, опубликованную Qiagen, описывающую систему). Векторы pQE имеют промотор фага T5 (распознаваемый РНК-полимеразой *E.coli*) и двойной lac оператор – репрессор модуль для обеспечения строго регулируемой экспрессии рекомбинантных белков *E.coli* на высоком уровне, синтетический сайт связывания рибосом (RBS II) для эффективной трансляции, кодирующую последовательность 6xHis tag метки, t_0 и T1 терминаторы транскрипции, ColE1 «ориджин» (origin) репликации и ген бета-лактамазы для придания устойчивости к ампициллину. Векторы pQE позволяют размещать 6xHis tag на N- или C-конце рекомбинантного белка. Такие плазмиды включают pQE 32, pQE 30 и pQE 31, которые обеспечивают множественные сайты клонирования для всех трех рамок считывания и обеспечивают экспрессию N-концевых 6xHis-меченых белков. Другие типичные плазмидные векторы для трансформации клеток *E.coli* включают, например, векторы экспрессии pET (см. патент США: US 4,952,496; доступный от Novagen, Madison, WI; см. также литературу, опубликованную Novagen, описывающую систему). Такие плазмиды включают в себя pET 11a, который содержит T7lac промотор, терминатор T7, индуцибельный *E.coli* lac ператор и ген lac репрессора; pET 12a-с, который содержит

промотор T7, терминатор T7 и сигнал *ompT* секреции *E. coli*; и pET 15b и pET19b (Novagen, Madison, WI), которые содержат лидерную последовательность His-Tag [™] для использования при очистке с колонкой His и сайт расщепления тромбина, который позволяет расщеплять после очистки на колонке, области T7-lac промотора и T7 терминатора.

Как правило, векторы могут быть плазмидными, вирусными или другими, известными в данной области техники, используемыми для экспрессии модифицированного полипептида MTSP-1 *in vivo* или *in vitro*. Например, модифицированный полипептид MTSP-1 экспрессируется в клетках млекопитающих, включая, например, клетки яичника китайского хомячка (CHO).

Могут использоваться вирусные векторы, такие как векторы аденовируса, ретровируса или вируса коровьей оспы. В некоторых примерах вектор представляет собой дефектный или ослабленный ретровирусный или другой вирусный вектор (см. патент США: US 4,980,286). Например, может быть использован ретровирусный вектор, описанный в [137]. Эти ретровирусные векторы были модифицированы таким образом, чтобы удалить ретровирусные последовательности, которые не нужны для упаковки вирусного генома и интеграции в ДНК клетки-хозяина. В некоторых примерах вирусы, «вооруженные» нуклеиновой кислотой, кодирующей модифицированный полипептид MTSP-1, могут облегчать их репликацию и распространение в ткани-мишени. Вирус также может быть литическим вирусом или нелитическим вирусом, где вирус избирательно реплицируется под тканеспецифичным промотором. Поскольку вирусы размножаются, коэкспрессия полипептида MTSP-1 с вирусными генами будет способствовать распространению вируса *in vivo*.

4. Экспрессия

Модифицированные полипептиды MTSP-1 могут быть получены любым способом, известным специалистам в данной области техники, включая способы *in vivo* и *in vitro*. Модифицированные полипептиды MTSP-1 могут экспрессироваться в любом организме, подходящем для продуцирования необходимых количеств и форм белков, таких как, например, необходимые для введения и лечения. Клетки-хозяева экспрессии включают прокариотические и эукариотические организмы, такие как *E. coli*, дрожжи, растения, клетки насекомых, клетки млекопитающих, включая клеточные линии человека и трансгенных животных. Клетки-хозяева экспрессии (хозяева экспрессии) могут различаться по уровням продукции белка, а также по типам посттрансляционных модификаций, которые присутствуют в экспрессированных белках. Выбор хозяина экспрессии может быть сделан на основе этих и других факторов, таких как нормативные

требования и соображения безопасности, производственные затраты, а также необходимость и методы очистки. Специалист хорошо подготовлен для выбора подходящих хозяев и векторов.

Многие векторы экспрессии доступны и известны специалистам в данной области и могут быть использованы для экспрессии белков. На выбор вектора экспрессии будет влиять выбор системы экспрессии хозяина. В общем, векторы экспрессии могут включать промоторы транскрипции и, необязательно, энхансеры, факторы трансляции, сигналы терминирования транскрипции и сигналы терминирования трансляции. Векторы экспрессии, которые используются для стабильной трансформации, обычно имеют селективируемый маркер, который позволяет выбирать и поддерживать трансформированные клетки. В некоторых случаях источник репликации может использоваться для усиления числа копий вектора.

Модифицированные полипептиды MTSP-1 также могут быть использованы или экспрессированы в виде слитых белков. Например, слитый фермент может быть сконструирован с целью добавления дополнительной функциональности ферменту. Примеры ферментных слитых белков включают, но не ограничиваются ими, слияния сигнальной последовательности, метки (tag), такой как метка для локализации, например, метки His₆-tag или myc-tag, или метка для очистки, например, слияние GST и последовательности для направления секреции белка и/или мембранной ассоциации.

Например, представленный в настоящем документе, модифицированный полипептид MTSP-1 представляет собой такой, который генерируется путем экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей протеазный домен, указанной в любой из SEQ ID NO: 1-4, 11-13 и 21-59, или последовательности аминокислот, которая проявляет, по меньшей мере, 65%, 70%, 75%, 80%, 84%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в любом из SEQ ID NO: 1-4, 11-13 и 21-59.

Для длительного получения рекомбинантных белков с высоким выходом желательна стабильная экспрессия. Например, клеточные линии, которые стабильно экспрессируют модифицированный полипептид MTSP-1, могут быть трансформированы с использованием векторов экспрессии, которые содержат вирусные источники репликации или эндогенные элементы экспрессии и селективируемый маркерный ген.

После введения вектора клеткам можно дать расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде, прежде чем они переключаются на селективную среду. Целью селективируемого маркера является придание устойчивости к селекции, и его присутствие позволяет расти и восстанавливать клетки, которые успешно экспрессируют введенные последовательности.

Устойчивые клетки стабильно трансформированных клеток могут быть размножены с использованием методов культивирования тканей, подходящих для типов клеток.

Любое количество систем отбора можно использовать для восстановления трансформированных клеточных линий. К таким системам относятся, но не ограничиваются ими, гены тимидинкиназы вируса простого герпеса [138] и аденинфосфорибозилтрансферазы [139], которые могут быть использованы в ТК– или APRT–клетках соответственно. Кроме того, устойчивость к антиметаболитам, антибиотикам или гербицидам может быть использована в качестве основы для выбора системы. Например, DFIFR, который придает устойчивость к метотрексату [140]; npt, который придает устойчивость к аминогликозидам неомицину и G–418 [141]; и als или pat, которые придают устойчивость к хлорсульфурону и фосфинотрицинацетилтрансферазе соответственно.

Были описаны дополнительные селективируемые гены, например, trpB, который позволяет клеткам использовать индол вместо триптофана или hisD, который позволяет клеткам использовать гистинол вместо гистидина [142]. Видимые маркеры, такие как, но не ограничиваясь этим, антоцианины, бета–глюкуронидаза и ее субстрат, GUS и люцифераза и ее субстрат люциферин, также могут быть использованы для идентификации трансформантов, а также для количественного определения величины временной или стабильной экспрессии белка, относящейся к конкретной векторной системе [143].

Присутствие и экспрессию полипептидов MTSP–1 можно контролировать. Например, обнаружение функционального полипептида может быть определено путем тестирования кондиционированной среды на активность фермента гиалуронидазы в соответствующих условиях. В данном документе раскрыты иллюстративные анализы для оценки растворимости и активности экспрессированных белков.

а. Прокариотические клетки

Прокариоты, особенно кишечная палочка, обеспечивают систему для производства большого количества белков. Трансформация *E.coli* является простой и быстрой методикой, хорошо известной специалистам в данной области техники. Векторы экспрессии для *E.coli* могут содержать индуцибельные промоторы, такие промоторы полезны для индукции высоких уровней экспрессии белка и для экспрессии белков, которые проявляют некоторую токсичность для клеток–хозяев. Примеры индуцибельных промоторов включают lac–промотор, trp–промотор, гибридный tac–промотор, T7– и SP6–РНК–промоторы и промотор XPL с регулируемой температурой.

Белки, такие как любые из представленных в настоящем документе, могут быть экспрессированы в цитоплазматической среде *E.coli*. Цитоплазма является

восстановительной средой, и для некоторых молекул это может привести к образованию нерастворимых телец включения. Восстанавливающие агенты, такие как дитиотреитол и β -меркаптоэтанол, и денатурирующие агенты, такие как гуанидин-HCl (GuHCl) и мочевины, могут быть использованы для перерастворения белков. Альтернативным подходом является экспрессия белков в периплазматическом пространстве бактерий, которое обеспечивает окислительную среду и шаперонин-подобные и дисульфидные изомеразы, что может привести к продукции растворимого белка. Как правило, лидерная последовательность сливается с белком, который будет экспрессироваться, и направляет белок в периплазму. Затем лидерная последовательность удаляется сигнальными пептидазами внутри периплазмы. Примеры лидерных последовательностей для нацеливания на периплазму включают лидерство *pelB* из гена пектатлиазы и лидера, происходящего из гена щелочной фосфатазы. В некоторых случаях периплазматическая экспрессия допускает утечку экспрессированного белка в культуральную среду. Секреция белков обеспечивает быструю и простую очистку от супернатанта культуры. Белки, которые не секретируются, могут быть получены из периплазмы осмотическим лизисом. Подобно цитоплазматической экспрессии, в некоторых случаях белки могут становиться нерастворимыми, а денатурирующие и восстанавливающие агенты могут использоваться для облегчения солубилизации и рефолдинга. Температура индукции и роста также может влиять на уровни экспрессии и растворимости, обычно используются температуры между 25 и 37°C.

Как правило, бактерии продуцируют агликозилированные белки. Таким образом, если белки требуют гликозилирования для функции, гликозилирование может быть добавлено *in vitro* после очистки от клеток-хозяев.

б. Дрожжевые клетки

Дрожжи, такие как *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* и *Pichia pastoris*, являются хорошо известными хозяевами дрожжевой экспрессии, которые можно использовать для продуцирования белков, такими как любые, описанные здесь. Дрожжи могут быть трансформированы эписомальными реплицирующимися векторами или стабильной хромосомной интеграцией путем гомологичной рекомбинации. Как правило, индуцибельные промоторы используются для регуляции экспрессии генов. Примеры таких промоторов включают GAL1, GAL7 и GAL5 и металлотионеиновые промоторы, такие как CUP1, AOX1 или другой *Pichia* или другой дрожжевой промотор. Векторы экспрессии часто включают селективируемый маркер, такой как LEU2, TRP1, HIS3 и URA3, для отбора и поддержания трансформированной ДНК. Белки, экспрессируемые в дрожжах, часто растворимы. Совместная экспрессия с

шаперонинами, такими как BiP и протеин–дисульфид–изомераза, может улучшить уровни экспрессии и растворимость. Кроме того, белки, экспрессируемые в дрожжах, могут быть направлены на секрецию с использованием пептидных слитых сигналов секреции, таких как сигнал секреции альфа–фактора дрожжевого типа от *Saccharomyces cerevisiae*, и слияния с белками поверхности дрожжевой клетки, такими как спаривающийся рецептор адгезии Aga2p или глюкоамилаза *Arxula adeninivoram*. Сайт расщепления протеазой, такой как протеаза Kex–2, может быть сконструирован для удаления слитых последовательностей из экспрессированных полипептидов, когда они покидают путь секреции. Дрожжи также способны к гликозилированию по мотивам Asn–X–Ser/Thr.

в. Насекомые и клетки насекомых

Клетки насекомых, особенно с использованием бакуловирусной экспрессии, полезны для экспрессии полипептидов, таких как полипептиды MTSP–1. Клетки насекомых экспрессируют высокие уровни белка и способны к большинству посттрансляционных модификаций, используемых высшими эукариотами. Бакуловир имеет ограниченный спектр хозяев, который повышает безопасность и снижает регуляторные проблемы экспрессии эукариот. Типичные векторы экспрессии используют промотор, такой как полиэдриновый промотор бакуловируса, для повышения уровня экспрессии. Обычно используемые бакуловирусные системы включают бакуловирусы, такие как вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV), и вирус ядерного полиэдроза *bombyx mori* (BmNPV) и клеточную линию насекомых, такую как *Spodoptera frugiperda* (Sf9), *Pseudaletia unipuncta* (A7S) и *Danaus plexippus* (DpN1). Для повышения уровня экспрессии нуклеотидную последовательность экспрессируемой молекулы сливают непосредственно после кодона инициации полиэдрина вируса.

Сигналы секреции млекопитающих точно обрабатываются в клетках насекомых и могут использоваться для секреции экспрессированного белка в культуральную среду. Кроме того, клеточные линии *Pseudaletia unipuncta* (A7S) и *Danaus plexippus* (DpN1) продуцируют белки с паттернами гликозилирования, сходными с клеточными системами млекопитающих. Примерами клеток насекомых являются клетки, которые были изменены для снижения иммуногенности, включая клетки с «млекопитающими» векторами бакуловирусной экспрессии и клетки, в которых отсутствует фермент FT3.

Альтернативной системой экспрессии в клетках насекомых является использование стабильно трансформированных клеток. Клеточные линии, такие как клетки Schnieder 2 (S2) и Kc (*Drosophila melanogaster*) и клетки C7 (*Aedes albopictus*), могут быть использованы для экспрессии. Промотор металлотионеина *Drosophila* можно использовать для индукции высоких уровней экспрессии в присутствии индукции тяжелых металлов кадмием или

медью. Векторы экспрессии обычно поддерживаются с помощью селектируемых маркеров, таких как неомицин и гигромицин.

д. Млекопитающее

Системы экспрессии млекопитающих могут быть использованы для экспрессии белков, включая полипептиды MTSP-1. Экспрессирующие конструкции могут быть перенесены в клетки млекопитающих с помощью вирусной инфекции, такой как аденовирус, или путем прямого переноса ДНК, такого как липосомы, фосфат кальция, DEAE-декстран, и с помощью физических средств, таких как электропорация и микроинъекция. Векторы экспрессии для клеток млекопитающих обычно включают сайт мРНК сар, ТАТА-бокс, последовательность инициации трансляции (консенсусная последовательность Козака) и элементы полиаденилирования. Элементы IRES также могут быть добавлены для обеспечения бицистронной экспрессии с другим геном, таким как селектируемый маркер. Такие векторы часто включают промоторы-энхансеры транскрипции для обеспечения высокого уровня экспрессии, такие как промотор-энхансер SV40, промотор цитомегаловируса человека (CMV) и длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса (RSV). Эти промоторы-энхансеры активны во многих типах клеток. Тканевые и клеточные промоторы и энхансерные области также могут быть использованы для экспрессии. Иллюстративные области промотора/энхансера включают, но не ограничиваются ими, области от генов, таких как эластаза I, инсулин, иммуноглобулин, вирус опухоли молочной железы мыши, альбумин, альфа-фетопротейн, альфа-1-антитрипсин, бета-глобин, основной белок миелина, легкая цепь миозина 2 и контроль над генами гонадотропного релизинг-гормона. Селектируемые маркеры могут использоваться для выбора конкретных систем экспрессии и иподдержки уже имеющейся экспрессионной конструкции. Примеры селектируемых маркерных генов включают, но не ограничиваются ими, фосфотрансферазу гигромицина В, аденозиндеаминазу, ксантингуанинфосфорибозилтрансферазу, аминогликозидфосфотрансферазу, дигидрофолатредуктазу (DHFR) и тимидинкиназу. Например, экспрессия может быть выполнена в присутствии метотрексата для отбора только тех клеток, которые экспрессируют ген DHFR. Слияние с сигнальными молекулами клеточной поверхности, такими как TCR- β и Fc RI- γ , может направлять экспрессию белков в активном состоянии на клеточной поверхности.

Многие линии клеток доступны для экспрессии у млекопитающих, включая клетки мыши, крысы, обезьяны, курицы и хомяка. Типичные клеточные линии включают, но не ограничиваются ими, CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, мышинные NSO (не секретирующие) и другие клеточные линии миеломы, клеточные линии гибридомы и гетерогибридомы,

лимфоциты, фибробласты, Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, Клетки 293S, 2B8 и НКВ. Также доступны клеточные линии, адаптированные к бессывороточной среде, которая облегчает очистку секретируемых белков из среды для культивирования клеток. Примеры включают клетки CHO-S (Invitrogen, Carlsbad, CA, номер по каталогу 11619-012) и бессывороточную клеточную линию EBNA-1 [144]. Также доступны клеточные линии, которые адаптированы для роста в специальных средах, оптимизированных для максимальной экспрессии. Например, клетки CHO DG44 адаптированы для выращивания в суспензионной культуре в химически определенной среде, не содержащей животных,

е. Растения

Трансгенные растительные клетки и растения можно использовать для экспрессии белков, таких как любые описанные здесь. Экспрессирующие конструкции обычно переносят в растения с использованием прямого переноса ДНК, такого как бомбардировка микрочастицами и ПЭГ-опосредованный перенос в протопласты, и с помощью агробактериальной трансформации. Векторы экспрессии могут включать последовательности промотора и энхансера, элементы терминации транскрипции и элементы контроля трансляции. Векторы экспрессии и методы трансформации обычно делятся между двудольными хозяевами, такими как арабидопсис и табак, и однодольными хозяевами, такими как кукуруза и рис. Примеры растительных промоторов, используемых для экспрессии, включают промотор вируса мозаики цветной капусты, промотор нопалин-синтазы, промотор рибозобисфосфат-карбоксилазы и промоторы убиквитина и UBQ3.

Выбираемые маркеры, такие как гигромицин, фосфоманнозоизомеразы и неомицинофосфотрансфераза, часто используются для облегчения отбора и поддержания трансформированных клеток. Трансформированные растительные клетки могут поддерживаться в культуре в виде клеток, агрегатов (калусной ткани) или регенерироваться в целые растения. Трансгенные растительные клетки также могут включать водоросли, сконструированные для получения полипептидов гиалуронидазы. Поскольку растения имеют различные паттерны гликозилирования, чем клетки млекопитающих, это может влиять на выбор белка, продуцируемого этими хозяевами.

5. Очистка

Клетки-хозяева, трансформированные последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей модифицированный полипептид MTSP-1, можно культивировать в условиях, подходящих для экспрессии и выделения кодируемого белка из клеточной культуры. Белок, продуцируемый рекомбинантной клеткой, обычно сконструирован таким образом, что он секретируется, но он может содержаться внутриклеточно в зависимости от последовательности и/или используемого вектора. Как будет понятно специалистам в

данной области, векторы экспрессии, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую MTSP-1, могут быть сконструированы с сигнальными последовательностями, которые облегчают прямую секрецию MTSP-1 через прокариотическую или эукариотическую клеточную мембрану.

Таким образом, способ очистки полипептидов из клеток-хозяев зависит от выбранных клеток-хозяев и систем экспрессии. Для секретируемых молекул белки обычно очищают от культуральной среды после удаления клеток. Для внутриклеточной экспрессии клетки могут быть лизированы, а белки очищены от экстракта. Когда трансгенные организмы, такие как трансгенные растения и животные, используются для экспрессии, ткани или органы могут использоваться в качестве исходного материала для получения экстракта лизированных клеток.

Кроме того, получение трансгенных животных может включать получение полипептидов в молоке или яйцах, которые могут быть собраны, и, если необходимо, белки могут быть экстрагированы и дополнительно очищены с использованием стандартных способов в данной области.

Белки, такие как модифицированные полипептиды MTSP-1, могут быть очищены с использованием стандартных методов очистки белков, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, SDS-PAGE, фракционирование по размеру и эксклюзионную хроматографию, осаждение сульфатом аммония и ионообменную хроматографию, такую как анионообменная хроматография. Методы аффинной очистки также могут быть использованы для повышения эффективности и чистоты препаратов. Например, антитела, рецепторы и другие молекулы, которые связывают белки MTSP-1, могут быть использованы для аффинной очистки.

Экспрессирующие конструкции также могут быть сконструированы для добавления аффинной метки к белку, такой как метка малого убиквитиноподобного модификатора (SUMO), тус-эпитоп, GST-слияние или His6 и аффинная очистка с помощью SUMO или антитела тус, глутатионовой смолы и Ni-смолы, соответственно. Такие метки могут быть присоединены к нуклеотидной последовательности, кодирующей MTSP-1, как описано в другом месте данного документа, что может облегчить очистку растворимых белков. Например, модифицированный полипептид MTSP-1 может быть экспрессирован в виде рекомбинантного белка с одним или несколькими дополнительными полипептидными доменами, добавленными для облегчения очистки белка. Такие облегчающие очистку домены включают, но не ограничиваются ими, хелатирующие металлы пептиды, такие как

модули гистидин–триптофан, которые обеспечивают очистку на иммобилизованных металлах, домены белка А, которые позволяют очистить иммобилизованный иммуноглобулин, и домен, используемый в системе очистки расширения/сродства FLAGS (Immunex Corp., СिएТЛ Вашингтон.). Включение расщепляемой линкерной последовательности, такой как фактор Ха или энтерокиназа (Invitrogen, Сан–Диего, Калифорния), между доменом очистки и экспрессированным полипептидом MTSP–1 является полезным для облегчения очистки. Один такой вектор экспрессии обеспечивает экспрессию слитого белка, содержащего полипептид MTSP–1 и сайт расщепления энтерокиназой. Метка малого убиквитиноподобного модификатора (SUMO) облегчает очистку с помощью FMIAC (аффинная хроматография с ионами иммобилизованных металлов), в то время как сайт расщепления энтерокиназой обеспечивает средство для очистки полипептида от слитого белка.

Чистота может быть оценена любым способом, известным в данной области, включая гель–электрофорез, ортогональные методы FPLC, окрашивание и спектрофотометрические методы. Экспрессированный и очищенный белок может быть проанализирован с использованием любого анализа или метода, известного специалисту в данной области, например, любого, описанного в разделе 5. Они включают анализы, основанные на физических и/или функциональных свойствах белка, включая, но не ограничиваясь этим, анализ с помощью гель–электрофореза, иммуноанализа и анализа активности MTSP–1.

6. Дополнительные модификации

Модифицированные полипептиды MTSP–1, представленные в настоящем документе, могут быть модифицированы для улучшения или изменения фармакокинетических и фармакологических свойств. В частности, модифицированные полипептиды MTSP–1 могут быть конъюгированы с полимером, таким как фрагмент ПЭГ или декстран или сиаилированы, для снижения иммуногенности и/или увеличения периода полужизни в сыворотке и других жидкостях организма, включая стекловидное тело.

а. ПЭГилирование

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) используется в биоматериалах, биотехнологии и медицине, главным образом потому, что ПЭГ является биосовместимым, нетоксичным, водорастворимым полимером, который обычно неиммуногенный [145]. В области доставки лекарственных средств производные ПЭГ широко используются в ковалентном прикреплении (то есть, «ПЭГилировании») к белкам для снижения иммуногенности, протеолиза и почечного клиренса, а также чтобы увеличить период полужизни в сыворотке

и повысить растворимость [146]. Аналогичным образом, ПЭГ присоединяют к относительно гидрофобным лекарственным средствам с низкой молекулярной массой для повышения растворимости, снижения токсичности и изменения биораспределения. Как правило, ПЭГилированные препараты вводятся в виде растворов.

Смежным применением является синтез сшитых разлагаемых ПЭГ–сетей или составов для использования при доставке лекарств, поскольку большая часть того же химического состава, который используется при разработке разлагаемых растворимых носителей лекарств, также может быть использована при конструировании разлагающихся гелей [147]. Также известно, что межмакромолекулярные комплексы могут образовываться путем смешивания растворов двух комплементарных полимеров. Такие комплексы обычно стабилизируются электростатическими взаимодействиями (полианион–поликатион) и/или водородными связями (поликислота–полибаз) между вовлеченными полимерами и/или гидрофобными взаимодействиями между полимерами в водной среде [148]. Например, смешивание растворов полиакриловой кислоты (РААс) и полиэтиленоксида (ПЭО) в надлежащих условиях приводит к образованию комплексов, основанных главным образом на водородных связях. Диссоциация этих комплексов в физиологических условиях использовалась для доставки не ПЭГилированных лекарств. Кроме того, комплексы комплементарных полимеров были образованы из гомополимеров и сополимеров.

Известны многочисленные реагенты для ПЭГилирования, как и фрагменты ПЭГ для терапевтических белков. Реагенты и ПЭГ–фрагменты коммерчески доступны. Такие реагенты включают реакцию полипептида с такими реагентами (не ограничиваясь ими) как: ПЭГ, активированный N–гидроксисукцинимидом (NHS), сукцинимидил мПЭГ, мПЭГ2–N–гидроксисукцинимид, мПЭГ сукцинимидил альфа–метилбутаноат, мПЭГ сукцинимидил пропионат, мПЭГ сукцинимидил бутанонат, сукцинимидиловый эфир 3–гидроксипропановой кислоты, гомобифункциональный ПЭГ–сукцинимидилпропионат, гомобифункциональный ПЭГ–пропиональдегид, гомобифункциональный ПЭГ–бутиральдегид, ПЭГ малеимид, ПЭГ гидразид, p–нитрофенил–карбонат ПЭГ, мПЭГ бензотриазолкарбонат, ПЭГ пропиональдегид, мПЭГ бутриальдегид, разветвленный мПЭГ2 бутиральдегид, мПЭГ ацетил, мПЭГ пиперидон, мПЭГ метилкетон, мПЭГ–безлинкерный малеимид, m–ПЭГ винилсульфон, мПЭГ тиол, мПЭГ ортопиридилтиоэфир, мПЭГ ортопиридилдисульфид, Fmoc–ПЭГ–NHS, Boc–ПЭГ–NHS, ПЭГ–NHS винилсульфон, ПЭГ–NHS акрилат, ПЭГ–NHS флуоресцеин (см., например, [77 – 78]; а также, патенты и патентные публикации: US 5,672,662; US 5,932,462; US 6,495,659; US 6,737,505; US 4,002,531; US 4,179,337; US 5,122,614; US 5,324,844; US 5,446,090; US 5,612,460; US A 5,644,575; US 5,766,581; US 5,795,569; US 5,808,096; US 5,900,461; US 5,919,455; US

5,985,263; US 5,990,237; US 6,113,906; US 6,214,966; US 6,258,351; US 6,340,742; US 6,413,507; US 6,420,339; US 6,437,025; US 6,448,369; US 6,461,802; US 6,828,401; US 6,858,736; US 2001/0021763; US 2001/0044526; US 2001/0046481; US 2002/0052430; US 2002/0072573; US 2002/0156047; US 2003/0114647; US 2003/0143596; US 2003/0158333; US 2003/0220447; US 2004/0013637; US 2004/0235734; WO 05/00360; US 2005/0114037; US 2005/0171328; US 2005/0209416; EP 01064951; EP 0822199; WO 00176640; WO 00/02017; WO 02/49673; WO 94/28024; и WO 01/87925).

В одном примере полиэтиленгликоль имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 3 кДа до примерно 50 кДа и, как правило, от примерно 5 кДа до примерно 30 кДа. Ковалентное присоединение ПЭГ к лекарственному средству (известное как «ПЭГилирование») может быть осуществлено известными методами химического синтеза. Например, ПЭГилирование белка может быть осуществлено путем взаимодействия активированного NHS ПЭГ с белком в подходящих условиях реакции.

Хотя было описано множество реакций для ПЭГилирования, те, которые наиболее широко применимы, придают направленность, используют мягкие условия реакции и не требуют обширной последующей обработки для удаления токсичных катализаторов или побочных продуктов. Например, монометокси-ПЭГ (мПЭГ) имеет только один реакционноспособный концевой гидроксил, и, таким образом, его использование ограничивает некоторую гетерогенность полученной смеси ПЭГ-белковый продукт. Активация гидроксильной группы на конце полимера, противоположном концевой метоксигруппе, как правило, необходима для достижения эффективного ПЭГилирования белка с целью сделать дериватизированный ПЭГ более восприимчивым к нуклеофильной атаке. Атакующий нуклеофил обычно представляет собой эпсилон-аминогруппу лизильного остатка, но другие амины также могут реагировать (например, N-концевой альфа-амин или кольцевые амины гистидина), если местные условия являются благоприятными. Более направленное прикрепление возможно в белках, содержащих один лизин или цистеин. Последний остаток может быть нацелен ПЭГ малеимидом для тиол-специфической модификации.

Альтернативно, ПЭГ гидразид может реагировать с периодически окисленным ферментом, разлагающим гиалуронан, и восстанавливаться в присутствии NaCNBH_3 . Более конкретно, ПЭГилированные CMP-сахара могут взаимодействовать с расщепляющим гиалуронан ферментом в присутствии подходящих гликозилтрансфераз. Одним из методов является метод «ПЭГилирования», при котором ряд полимерных молекул связан с рассматриваемым полипептидом. При использовании этого метода иммунная система испытывает трудности в распознавании эпитопов на поверхности полипептида,

ответственных за образование антител, что снижает иммунный ответ. Для полипептидов, вводимых непосредственно в систему кровообращения организма человека для придания определенного физиологического эффекта (например, фармацевтических препаратов), типичным потенциальным иммунным ответом является ответ IgG и/или IgM, тогда как полипептиды, которые вдыхаются через дыхательную систему (то есть промышленные полипептиды) потенциально могут вызывать ответ IgE (т.е. аллергический ответ). Одна из теорий, объясняющих снижение иммунного ответа, заключается в том, что полимерная молекула (ы) экранирует (ют) эпитоп (ы) на поверхности полипептида, ответственного за иммунный ответ, приводящий к образованию антител. Другая теория или, по крайней мере, частичный фактор заключается в том, что чем тяжелее конъюгат, тем больше снижается иммунный ответ.

Обычно для получения ПЭГилированного модифицированного полипептида MTSP-1, представленного в настоящем документе, ПЭГ-фрагменты конъюгируют посредством ковалентного присоединения с полипептидами. Методы ПЭГилирования включают, но не ограничиваются ими, специализированные линкеры и химию связывания [66], присоединение множества групп ПЭГ к одному сайту конъюгации (например, как при использовании разветвленных ПЭГ, см., например, [67], сайт-специфическое ПЭГилирование и/или моно-ПЭГилирование [68] и сайт-направленное ферментативное ПЭГилирование [69]. Способы и методики, описанные в данной области техники, могут продуцировать белки, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 производных ПЭГ или ПЭГ, присоединенных к одной молекуле белка (см., например, патент публикация США № 2006/0104968).

б. Слитые белки

Получение слитых с другими фрагментами терапевтических белков, такое как ПЭГилирование, конъюгирование с альбумином, целевыми фрагментами, такими как антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, иммуноглобулинами, слияния Fc, слияние с альбумином (HSA), получение слитых белков XTEN и модификация паттернов гликозилирования, известны, например, из [149] и приведены для обзора разнообразных слитых белков для улучшения фармакокинетических свойств терапевтических белков). Любой из этих известных способов улучшения фармакологических свойств терапевтических средств может быть применен к модифицированным полипептидам MTSP-1, представленным здесь.

Также предложены слитые белки, содержащие модифицированный полипептид MTSP-1, представленный здесь, и один или несколько других полипептидов. Предлагаются фармацевтические композиции, содержащие такие слитые белки, составленные для

введения подходящим путем. Слитые белки образуются путем связывания в любом порядке модифицированного полипептида MTSP-1 и другого полипептида, такого как антитело или его фрагмент, фактор роста, рецептор, лиганд и другой такой агент, с целью облегчения очистки протеазы, изменения фармакодинамические свойства полипептида MTSP-1 путем направления модифицированного полипептида MTSP-1 в целевую клетку или ткань и/или увеличения экспрессии или секреции модифицированного полипептида MTSP-1. В содержащем модифицированный полипептид MTSP-1 слитом белке, модифицированный полипептид MTSP-1 может соответствовать всей или его каталитически активной части полипептида MTSP-1. В некоторых вариантах осуществления полипептид MTSP-1 или его каталитически активная часть представляет собой модифицированный полипептид MTSP-1, представленный в настоящем документе. Предлагаемые в настоящем документе слитые белки сохраняют практически всю свою специфичность и/или селективность в отношении белка С3 комплемента. Как правило, слитые полипептиды MTSP-1 сохраняют субстратную специфичность и/или селективность по меньшей мере примерно на 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90 или 95% по сравнению с не-слитым MTSP-1 полипептидом, включая 96%, 97%, 98%, 99% или более субстратную специфичность по сравнению с полипептидом MTSP-1, который не является слитым белком.

Связывание модифицированного полипептида MTSP-1 и другого полипептида можно осуществлять прямо или косвенно через линкер. В одном примере связь может быть химической связью, такой как гетеробифункциональные агенты или тиоловые связи или другие подобные связи. Слияние полипептида MTSP-1 с другим полипептидом может происходить на N- или C-конце полипептида MTSP-1. Неограничивающие примеры полипептидов, которые можно использовать в слитых белках с модифицированным полипептидом MTSP-1, представленным в настоящем документе, включают, например, полипептид GST (глутатион-S-трансфераза), домен Fc из иммуноглобулина G или гетерологичную сигнальную последовательность. Слитые белки могут содержать дополнительные компоненты, такие как мальтозосвязывающий белок *E. coli* (MBP), которые способствуют поглощению белка клетками (см. Международную патентную публикацию № WO 01/32711).

Слитый белок полипептида MTSP-1 может быть получен стандартными рекомбинантными методами. Например, фрагменты ДНК, кодирующие разные полипептидные последовательности, могут быть лигированы вместе в соответствии с общепринятыми методами, например, путем использования тупых концов или липких концов для лигирования, расщепления рестриктазой для обеспечения соответствующих концов, заполнения связных концов в зависимости от ситуации, обработка щелочной

фосфатазой во избежание нежелательного соединения и ферментативное лигирование. В другом варианте слитый ген может быть синтезирован обычными методами, включая автоматические синтезаторы ДНК. Альтернативно, ПЦР-амплификация фрагментов гена может быть проведена с использованием якорных праймеров, которые вызывают образование комплементарных связей между двумя последовательными фрагментами гена, которые впоследствии могут быть разорваны, после чего фрагменты гена могут быть повторно амплифицированы для генерирования химерной последовательности гена [150]. Более того, коммерчески доступны многие векторы экспрессии, которые уже кодируют слитый фрагмент (например, полипептид GST). Нуклеиновую кислоту, кодирующую MTSP-1, можно клонировать в такой вектор экспрессии, чтобы слитый фрагмент был связан в рамке с полипептидом MTSP-1.

Слияние белков с Fc, слияние с человеческим сывороточным альбумином, слияние с карбоксиконцевым пептидом являются известными модификациями для улучшения фармакокинетики пептида или биологических лекарственных средств. Среди них – конъюгирование с монометоксиполиэтиленгликолем с линейной или разветвленной цепью (ПЭГ), что приводит к увеличению молекулярной массы и гидродинамического радиуса, а также к снижению скорости клубочковой фильтрации почкой.

Другой подход к улучшению фармакокинетических параметров включает модификацию паттернов гликозилирования, что приводит к снижению клиренса и увеличению периода полувыведения.

7. Молекулы нуклеиновых кислот

Здесь представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды MTSP-1. Молекулы нуклеиновой кислоты включают аллельные варианты или варианты сплайсинга любого кодируемого полипептида MTSP-1 или его каталитически активной части. В одном варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, представленные в настоящем документе, имеют по меньшей мере 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95 или 99% идентичности последовательности или гибридизуются в условиях средней или высокой строгости по меньшей мере на 70% от полной длины любого полипептида MTSP-1, кодируемого нуклеиновой кислотой, или его каталитически активной части. В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты может включать молекулы с вырожденными последовательностями кодонов любого из полипептидов MTSP-1 или их каталитически активных частей, таких как указанные в настоящем документе. Типичные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие каркасный белок или модифицированные протеазы или их каталитически активные части, имеют последовательность нуклеотидов, как указано в любой из SEQ ID NO: 60–98.

Также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты или слитые белки, содержащие каталитически активную часть молекулы нуклеиновой кислоты, функционально связанную с промотором, таким как индуцибельный промотор для экспрессии в клетках млекопитающих. Такие промоторы включают, но не ограничиваются ими, промоторы CMV и SV40; промоторы аденовируса, такие как промотор гена E2, который реагирует на онкопротеин E7 HPV; промотор PV, такой как промотор p89 PBV, который реагирует на белок PV E2; и другие промоторы, которые активируются ВИЧ или PV или онкогенами.

MTSP-1 протеаза, представленная в настоящем документе, также может быть доставлена в клетки в векторах переноса гена. Векторы переноса также могут дополнительно кодировать другой терапевтический агент (ы) для лечения заболевания или расстройства, такого как ревматоидный артрит или сердечно-сосудистое заболевание или AMD или DGF, для лечения которых вводят протеазу.

Векторы переноса, кодирующие протеазу, можно использовать системно, вводя нуклеиновую кислоту субъекту. Например, вектор переноса может представлять собой вирусный вектор, такой как вектор аденовируса. Векторы, кодирующие протеазу, также могут быть включены в стволовые клетки и такие стволовые клетки могут вводиться субъекту для терапии, например, путем трансплантации или приживления стволовых клеток в местах терапии. Например, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) могут быть сконструированы для экспрессии протеазы, и такие МСК приживаются в месте трансплантации для терапии.

Ж. КОМПОЗИЦИИ, СОСТАВЫ И ДОЗИРОВКИ

Фармацевтические композиции, содержащие модифицированные полипептиды MTSP-1, модифицированные слитые белки MTSP-1 или кодирующие молекулы нуклеиновой кислоты, могут быть приготовлены любым общепринятым способом путем смешивания выбранного количества полипептида с одним или несколькими физиологически приемлемыми носителями или наполнителями.

Выбор носителя или наполнителя находится в пределах квалификации управляющей профессии и может зависеть от ряда параметров. Они включают, например, способ введения (то есть системный, оральный, назальный, легочный, местный, топический или любой другой способ) и расстройство, которое лечат. Фармацевтические композиции, представленные в настоящем документе, могут быть составлены для однократного (прямого) введения или для разбавления или для другой модификации. Концентрации соединений в составах эффективны для доставки такого количества, которое при введении

является эффективным для предполагаемого лечения. Как правило, композиции составлены для однократного введения. Для приготовления композиции массовую долю соединения или их смеси растворяют, суспендируют, диспергируют или смешивают иным образом в выбранном носителе в эффективной концентрации, так что состояние, которое подвергается лечению, облегчается или улучшается. Фармацевтические носители или носители, подходящие для введения соединений, представленных в настоящем документе, включают любые такие носители, известные специалистам в данной области, которые подходят для конкретного способа введения.

1. Введение модифицированных полипептидов MTSP-1.

Полипептиды могут быть приготовлены как единственный фармацевтически активный ингредиент в композиции или могут быть объединены с другими активными ингредиентами. Полипептиды могут быть нацелены на доставку, например, путем конъюгации с нацеливающим агентом, таким как антитело. Липосомные суспензии, включая тканевые целевые липосомы, также могут быть пригодны в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области. Например, липосомные составы могут быть получены, как описано в патенте США № 4522811. Липосомная доставка также может включать составы с замедленным высвобождением, включая фармацевтические матрицы, такие как коллагеновые гели и липосомы, модифицированные фибронектином [151].

Активное соединение включено в фармацевтически приемлемый носитель в количестве, достаточном для оказания терапевтически полезного эффекта при отсутствии нежелательных побочных эффектов у субъекта, которого лечат. Терапевтически эффективную концентрацию можно определить эмпирически путем тестирования соединений в известных системах *in vitro* и *in vivo*, таких как анализы, представленные в настоящем документе.

Полипептиды MTSP-1, представленные в настоящем документе (то есть активные соединения), можно вводить *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo* путем контакта смеси, такой как жидкость организма, такой как стекловидное тело, или другого образца ткани, с MTSP-1 полипептидом, представленным здесь, включая любой из модифицированных полипептидов MTSP-1, представленных здесь. Например, при введении соединения *ex vivo*, жидкость организма или образец ткани от субъекта могут контактировать с полипептидами MTSP-1, которые нанесены на трубку или фильтр, такой как, например, фильтр в байпасной машине. При введении *in vivo* активные соединения можно вводить любым подходящим путем, например перорально, назально, легочно, парентерально, внутривенно,

интрадермально, интравитреально, периокулярно, подкожно или местно, в жидкой, полужидкой или твердой форме и сконструированы способом, подходящим для каждого пути введения.

Определение дозировки находится в компетенции врача и может зависеть от конкретного расстройства, пути введения и субъекта. Примерные дозы будут дозироваться в дозе 0,1–1 мг.

Модифицированный полипептид MTSP–1 и физиологически приемлемые соли и сольваты могут быть скомбинированы для введения путем ингаляции (через рот или нос), перорального, трансдермального, легочного, парентерального или ректального введения. Для введения путем ингаляции модифицированный полипептид MTSP–1 может доставляться в форме аэрозольного распыления из упаковок под давлением или распылителя с использованием подходящего пропеллента, например дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, диоксида углерода или другого подходящего газа. В случае аэрозоля под давлением единица дозирования может быть определена путем предоставления клапана для доставки отмеренного количества. Могут быть приготовлены капсулы и картриджи, например, из желатина для использования в ингаляторе или инсуффляторе, содержащие порошковую смесь терапевтического соединения и подходящую порошковую основу, такую как лактоза или крахмал.

Для легочного введения в легкие модифицированный полипептид MTSP–1 может быть доставлен в форме аэрозольного распыления из небулайзера, турбонагнетателя или микропроцессорного дозированного орального ингалятора с использованием подходящего пропеллента. Как правило, размер частиц аэрозоля невелик, например, в диапазоне от 0,5 до 5 микрон. В случае фармацевтической композиции, составленной для легочного введения, поверхностно–активные вещества обычно не используются. Легочная доставка лекарств является перспективным неинвазивным методом системного введения. Легкие представляют собой привлекательный путь доставки лекарств, главным образом, из–за большой площади абсорбции, тонкого альвеолярного эпителия, обширной васкуляризации, отсутствия эффекта первого прохождения через печень лекарственных средств и относительно низкой метаболической активности.

Для перорального введения фармацевтические композиции могут принимать форму, например, таблеток, пилюль, жидких суспензий или капсул, приготовленных обычными способами с фармацевтически приемлемыми наполнителями, такими как связующие агенты (например, предварительно желатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлоза); наполнители (например, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза или гидрофосфат кальция); смазывающие

вещества (например, стеарат магния, тальк или диоксид кремния); дезинтегранты (например, картофельный крахмал или гликолят крахмала натрия); или смачивающие агенты (например, лаурилсульфат натрия). Таблетки могут быть покрыты оболочкой способами, хорошо известными в данной области. Жидкие препараты для перорального введения могут принимать форму, например, растворов, сиропов или суспензий, или они могут быть представлены в виде сухого продукта для разведения водой или другим подходящим носителем перед использованием. Такие жидкие препараты могут быть получены обычными способами с фармацевтически приемлемыми добавками, такими как суспендирующие агенты (например, сироп сорбита, производные целлюлозы или гидрогенизированные пищевые жиры); эмульгирующие агенты (например, лецитин или акация); неводные носители (например, миндальное масло, масляные сложные эфиры, этиловый спирт или фракционированные растительные масла); и консерванты (например, метил или пропил-*p*-гидроксibenзоаты или сорбиновая кислота). Препараты также могут содержать буферные соли, ароматизаторы, красители и подсластители, в зависимости от ситуации.

Препараты для перорального введения могут быть приготовлены для контролируемого высвобождения активного соединения. Для буккального введения композиции могут принимать форму таблеток или пастилок, составленных общепринятым способом.

Модифицированные полипептиды MTSP-1 могут быть приготовлены в виде депо-препарата. Такие препараты длительного действия можно вводить имплантацией (например, подкожно или внутримышечно) или внутримышечной инъекцией. Так, например, терапевтические соединения могут быть составлены из подходящих полимерных или гидрофобных материалов (например, в виде эмульсии в приемлемом масле) или ионообменных смол или в виде труднорастворимых производных, например, в виде труднорастворимой соли.

Модифицированный полипептид MTSP-1 может быть приготовлен для парентерального введения инъекцией (например, болюсной инъекцией или непрерывной инфузией).

Составы для инъекций могут быть представлены в виде стандартной лекарственной формы (например, в ампулах или в контейнерах с множеством доз) с добавленным консервантом. Композиции могут принимать такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и могут содержать формулирующие агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, активный ингредиент может быть в форме лиофилизированного порошка

для разведения перед применением подходящим носителем, например стерильной апиrogenной водой.

Модифицированные полипептиды MTSP-1 могут быть приготовлены для глазной или офтальмологической доставки. Глазная доставка лекарственного средства включает, например, местную, оральную или системную и/или инъекционную доставку. Например, модифицированный полипептид (ы) MTSP-1 или фармацевтическую композицию, содержащую модифицированный полипептид (ы) MTSP-1, можно вводить местно, например, в форме глазных капель. В другом примере модифицированный полипептид (ы) MTSP-1 или фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный полипептид (ы) MTSP-1, могут вводиться периокулярным и/или интравитреальным введением, таким как, например, периокулярная или интравитреальная инъекция (и).

Модифицированные полипептиды MTSP-1 или фармацевтическая композиция, содержащая модифицированные полипептиды MTSP-1 или нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированные полипептиды MTSP-1, могут быть составлены для системного введения для лечения DGF. В другом примере модифицированные полипептиды MTSP-1 или фармацевтическая композиция, содержащая модифицированные полипептиды MTSP-1 или нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированные полипептиды MTSP-1, вводятся непосредственно в почку или в ткани или органы, прилегающие или окружающие пересаженную почку. Модифицированные полипептиды MTSP-1 или фармацевтическую композицию, содержащую модифицированные полипептиды MTSP-1, можно вводить до времени трансплантации аллотрансплантата или во время трансплантации с продолжением введения хроническим образом и/или можно вводить во время эпизода отторжения.

Фармацевтические композиции могут быть приготовлены для местного или топического применения, такого как местное нанесение на кожу (трансдермально) и слизистые оболочки, такие как в глазу, в форме гелей, кремов и лосьонов и для нанесения на глаз или для внутрикостного стерильного или интраспинального применения. Такие растворы, особенно предназначенные для офтальмологического применения, могут быть приготовлены в виде 0,01% –10% изотонических растворов и pH около 5–7 с соответствующими солями. Соединения могут быть приготовлены в виде аэрозолей для местного применения, например, путем ингаляции (см., патенты США: US 4,044,126, 4,414,209 и 4,364,923; описаны аэрозоли для доставки стероида, полезного для лечения воспалительных заболеваний, в частности астмы).

Концентрация активного соединения в лекарственной композиции зависит от скорости всасывания, инактивации и выделения активного соединения, схемы дозировки и вводимого количества, а также от других факторов, известных специалистам в данной области. Как описано далее в настоящем документе, дозировки могут быть определены эмпирически с использованием сравнений свойств и активностей (например, расщепления одного или нескольких белков комплемента) модифицированного полипептида MTSP-1 по сравнению с немодифицированным полипептидом MTSP-1 и/или полипептидом MTSP-1 дикого типа и/или эталонным полипептидом MTSP-1.

Композиции, если желательно, могут быть представлены в упаковке, в наборе или дозирующем устройстве, которые могут содержать одну или несколько стандартных дозированных форм, содержащих активный ингредиент. В некоторых примерах композиция может быть нанесена на устройство, такое как, например, трубка или фильтр, например, в байпасной машине. Упаковка, например, содержит металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка. Упаковка или дозирующее устройство могут сопровождаться инструкциями по применению. Композиции, содержащие активные агенты, могут быть упакованы в виде изделий, содержащих упаковочный материал, агент, представленный здесь, и этикетку, которая указывает на расстройство, для которого представляется агент.

Также предоставлены композиции, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, включая векторы экспрессии, кодирующие полипептиды MTSP-1. В некоторых вариантах осуществления композиции, молекулы нуклеиновых кислот, включая векторы экспрессии, кодирующих полипептиды MTSP-1 являются подходящими для генной терапии. Вместо доставки белка нуклеиновую кислоту можно вводить *in vivo*, например, системно или другим путем, или *ex vivo*, например, путем удаления клеток, в том числе лимфоцитов, введения в них нуклеиновых кислот и реинтродукции в хозяина или совместимого реципиента.

2. Введение нуклеиновых кислот, кодирующих модифицированные полипептиды MTSP-1 (генная терапия).

Полипептиды MTSP-1 могут доставляться в клетки и ткани путем экспрессии молекул нуклеиновых кислот. Полипептиды MTSP-1 можно вводить в виде молекул нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды MTSP-1, включая методы *ex vivo* и прямую экспрессию *in vivo*. Нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в клетки и ткани любым способом, известным специалистам в данной области. Выделенная нуклеиновая кислота может быть включена в векторы для дальнейшей манипуляции. Примерами нуклеиновых кислот являются любые, которые кодируют или которые гибридизуются в

среде от средней до высокой жесткости с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид MTSP-1, или его каталитически активной частью, имеющей последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQ ID NO: 21–59. Типичные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие модифицированные полипептиды MTSP-1 или их каталитически активные части, имеют последовательность нуклеотидов, как указано в любой из SEQ ID NO: 60–98.

Способы введения полипептидов MTSP-1 путем экспрессии кодирующих молекул нуклеиновых кислот включают введение рекомбинантных векторов. Вектор может быть сконструирован так, чтобы оставаться эпизомальным, например, путем включения источника репликации, или может быть сконструирован для интеграции в хромосому в клетке. Полипептиды MTSP-1 также могут быть использованы в терапии экспрессии генов *ex vivo* с использованием векторов. Подходящие векторы генной терапии и способы доставки известны специалистам в данной области. Например, клетки могут быть сконструированы так, чтобы экспрессировать модифицированный полипептид MTSP-1, например, путем интеграции нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид MTSP-1, в геномную область, либо оперативно связанную с регуляторными последовательностями, либо такую, чтобы она была функционально связана с регуляторными последовательностями в геномное местоположение. Такие клетки затем можно вводить локально или системно субъекту, такому как пациент, нуждающийся в лечении. Типичные векторы для генной терапии *in vivo* и *ex vivo* включают вирусные векторы и невирусные векторы, такие как, например, липосомы или искусственные хромосомы.

Могут использоваться вирусные векторы, включая, например, аденовирусы, вирусы герпеса, аденоассоциированные вирусы (AAV), ретровирусы, такие как лентивирусы, EBV, SV40, цитомегаловирусные векторы, векторы вируса коровьей оспы и другие, предназначенные для генной терапии. Векторы могут быть теми, которые остаются эпизодическими, или теми, которые могут интегрироваться в хромосомы субъекта, подвергаемого лечению. Модифицированный полипептид MTSP-1 может быть экспрессирован вирусом, который вводят субъекту, нуждающемуся в лечении. Вирусные векторы, подходящие для генной терапии, включают аденовирус, аденоассоциированный вирус, ретровирусы, лентивирусы и другие, отмеченные выше. Например, технология экспрессии аденовируса хорошо известна в данной области техники, и способы получения и введения аденовируса также хорошо известны. Серотипы аденовируса доступны, например, из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Rockville, MD). Аденовирус можно использовать *ex vivo*, например, клетки выделяют у пациента, нуждающегося в лечении, и трансдуцируют модифицированным полипептид–

экспрессирующим вектором MTSP–1 аденовирусным вектором. После подходящего периода культивирования трансдуцированные клетки вводят субъекту локально и/или системно. Альтернативно, частицы аденовируса, экспрессирующие полипептид MTSP–1, выделяют и формулируют в фармацевтически приемлемом носителе для доставки терапевтически эффективного количества для предотвращения, облегчения или ослабления заболевания или состояния субъекта. В одном варианте осуществления заболевание, подлежащее лечению, вызывается активацией комплемента. Как правило, частицы аденовируса доставляются в дозе от 1 частицы до 10^{14} частиц на килограмм веса субъекта, обычно от 10^6 или 10^8 частиц до 10^{12} частиц на килограмм веса субъекта.

Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть введены в искусственные хромосомы и другие невирусные векторы. Искусственные хромосомы, такие как ACES [152], могут быть сконструированы для кодирования и экспрессии полипептида MTSP–1. Вкратце, искусственные хромосомы млекопитающих (MAC) предоставляют средства для введения больших количеств генетической информации в клетку в автономно реплицирующемся, неинтегрирующем формате. Уникальная среди MAC, система искусственной хромосомной экспрессии на основе спутниковой ДНК млекопитающих (ACES) может воспроизводимо генерироваться *de novo* в клеточных линиях разных видов и легко очищаться от хромосом клеток–хозяев. Очищенные ACES млекопитающих могут затем повторно вводиться в различные линии реципиентных клеток, где они стабильно поддерживаются в течение длительных периодов в отсутствие селективного давления с использованием системы ACE. Используя этот подход, специфическая нагрузка одной или двух генных целей была достигнута в клетках LMTK (–) и CHO.

Другим способом введения нуклеиновых кислот, кодирующих модифицированные полипептиды MTSP–1, является двухстадийная методика замены генов у дрожжей, начинающаяся с полного генома аденовируса (Ad2; [153]) клонировали в дрожжевую искусственную хромосому (YAC) и плазмиду, содержащую последовательности аденовируса для нацеливания на конкретную область в клоне YAC, кассету экспрессии для представляющего интерес гена и положительный и отрицательный селективируемый маркер. YAC представляют особый интерес, поскольку они позволяют включать более крупные гены. Этот подход можно использовать для конструирования векторов на основе аденовируса, содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из описанных модифицированных полипептидов MTSP–1, для переноса гена в клетки млекопитающих или целых животных.

Нуклеиновые кислоты могут быть инкапсулированы в носителе, таком как липосома, или введены в клетки, такие как бактериальная клетка, особенно в ослабленную

бактерию, или введены в вирусный вектор. Например, когда используются липосомы, белки, которые связываются с белком мембраны клеточной поверхности, связанным с эндоцитозом, могут использоваться для нацеливания и/или облегчения поглощения, например, капсидные белки или их фрагменты, тропические для определенного типа клеток, антитела для белков, которые подвергаются интернализации при циклировании, и белки, которые нацелены на внутриклеточную локализацию и увеличивают внутриклеточный период полураспада.

В некоторых вариантах осуществления желательно снабдить источник нуклеиновой кислоты агентом, нацеленным на клетки, таким как антитело, специфичное для белка мембраны клеточной поверхности или клетки-мишени, или лигандом для рецептора на клетке-мишени. Полинуклеотиды и векторы экспрессии, раскрытые в данном документе, могут быть получены любым подходящим способом. Кроме того, представлены векторы нуклеиновых кислот, содержащие молекулы нуклеиновых кислот, как описано выше. Дополнительно предоставлены векторы нуклеиновых кислот, содержащие молекулы нуклеиновых кислот, как описано выше, и клетки, содержащие эти векторы.

Для методов *ex vivo* и *in vivo* молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептид MTSP-1, вводятся в клетки от подходящего донора или субъекта, подлежащего лечению. Клетки, в которые может быть введена нуклеиновая кислота для целей терапии, включают, например, любой желаемый доступный тип клеток, подходящий для заболевания или состояния, подлежащего лечению, включая, но не ограничиваясь этим, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, кератиноциты, фибробласты, мышечные клетки, гепатоциты; клетки крови, такие как Т-лимфоциты, В-лимфоциты, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, мегакарициты, гранулоциты; различные стволовые клетки или клетки-предшественники, включая гематопоетические стволовые клетки или клетки-предшественники, например, такие как стволовые клетки, полученные из костного мозга, пуповинной крови, периферической крови, печени плода и другие их источники.

Для лечения *ex vivo* клетки от донора, совместимого с подлежащим лечению субъектом, или клетки от подлежащего лечению субъекта удаляют, нуклеиновую кислоту вводят в эти выделенные клетки и модифицированные клетки вводят субъекту.

Лечение включает в себя прямое введение, такое как, например, капсулирование внутри пористых мембран, которые имплантируют пациенту (см., например, патенты США: US 4,892,538 и US 5,283,187). Способы, подходящие для переноса нуклеиновой кислоты в клетки млекопитающих *in vitro*, включают использование липосом и катионных липидов (например, DOTMA, DOPE и DC-Choi), электропорацию, микроинъекцию, слияние клеток, DEAE-декстран и осаждение фосфатом кальция. Методы доставки ДНК

могут быть использованы для экспрессии полипептидов MTSP-1 *in vivo*. Такие способы включают липосомную доставку нуклеиновых кислот и доставку голый ДНК, включая локальную и системную доставку, такую как использование электропорации, ультразвука и доставки фосфата кальция. Другие методы включают микроинъекцию, слияние клеток, перенос генов, опосредованный хромосомами, перенос генов, опосредованный микроэлементами, и слияние сферопластов.

Экспрессия полипептида MTSP-1 *in vivo* может быть связана с экспрессией дополнительных молекул. Например, экспрессия полипептида MTSP-1 может быть связана с экспрессией цитотоксического продукта, такого как в сконструированном вирусе, или экспрессированного в цитотоксическом вирусе. Такие вирусы могут быть нацелены на конкретный тип клеток, который является мишенью для терапевтического эффекта. Экспрессированный полипептид MTSP-1 может быть использован для усиления цитотоксичности вируса.

Экспрессия полипептида MTSP-1 *in vivo* может включать оперативное связывание молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид MTSP-1, со специфическими регуляторными последовательностями, такими как клеточно-специфический или тканеспецифичный промотор. Полипептиды MTSP-1 также могут экспрессироваться из векторов, которые специфически инфицируют и/или реплицируются в типах клеток-мишеней и/или тканях. Индуцибельные промоторы могут быть использованы для селективной регуляции экспрессии полипептида MTSP-1.

Молекулы нуклеиновой кислоты, такие как обнаженные нуклеиновые кислоты или векторы, искусственные хромосомы, липосомы и другие носители, могут вводиться субъекту посредством системного введения, местного, местного и других путей введения. В системном и *in vivo* молекула нуклеиновой кислоты или носитель, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, может быть нацелена на клетку.

Введение также может быть прямым, например, путем введения вектора или клеток, которые обычно нацелены на клетку или ткань. Например, опухолевые клетки и пролиферирующие клетки могут быть мишенями для экспрессии полипептидов MTSP-1 *in vivo*. Клетки, используемые для экспрессии полипептида MTSP-1 *in vivo*, также включают клетки, аутологичные пациенту. Такие клетки могут быть удалены от пациента, в них введены нуклеиновые кислоты для экспрессии полипептида MTSP-1, а затем такие клетки могут быть введены пациенту, например, путем инъекции или приживления.

3. ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ И МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ

Модифицированные полипептиды MTSP-1, представленные в настоящем документе, нацелены на белок C3 комплемента и позволяют модулировать опосредованные

комплементом заболевания и расстройства. Терапевтические протеазы, такие как модифицированные полипептиды MTSP-1, представленные в настоящем документе, имеют много потенциальных преимуществ по сравнению с традиционными терапевтическими подходами. Главным из них является способность каталитически инактивировать мишени заболевания (то есть стехиометрию от одного ко многим). Таким образом, протеазы могут поддерживать эффективную регуляцию при концентрациях, значительно ниже целевой концентрации. Дополнительные дифференцирующие преимущества включают (1) необратимую инактивацию; (2) низкую дозировку; (3) снижение частоты дозирования; (4) небольшой молекулярный размер; (5) способность нацеливаться на посттрансляционные модификации; (6) способность нейтрализовать высокие целевые концентрации; и (7) способность ориентироваться вдали от активного сайта. Как терапевтическое средство протеаза должна по-прежнему проявлять следующие характеристики: (1) доступ к молекулярной мишени (внеклеточной) и (2) иметь достаточно строгую специфичность для мишени, критической для болезненного состояния. Модифицированные полипептиды MTSP-1, представленные в настоящем документе, можно использовать для лечения опосредованных комплементом заболеваний и расстройств.

Специалист в данной области понимает роль системы комплемента в процессах заболевания и знает о множестве таких заболеваний. Приведено краткое обсуждение типичных заболеваний и роли белка C3 комплемента в их этиологии и патологии. Модифицированные полипептиды MTSP-1 и молекулы нуклеиновой кислоты, представленные в настоящем документе, можно использовать для лечения любого состояния, в которое вовлечена активация пути комплемента, в частности для лечения воспалительных состояний, включая острые воспалительные состояния, такие как септический шок, и хронических воспалительных состояний, таких как ревматоидный артрит (RA). Острые и воспалительные состояния могут проявляться как иммуноопосредованное заболевание, такое как, например, аутоиммунное заболевание или повреждение ткани, вызванное воспалением, опосредованным иммунным комплексом. Опосредованное комплементом воспалительное состояние также может проявляться как нейродегенеративное или сердечно-сосудистое заболевание, которое имеет воспалительные компоненты. В этом разделе приведены примеры использования и способы введения модифицированных полипептидов MTSP-1, представленных в настоящем документе. Эти описанные способы лечения являются примерными и не ограничивают применение модифицированных полипептидов MTSP-1, представленных в настоящем документе. Такие способы включают, но не ограничиваются ими, способы лечения

физиологических и медицинских состояний, описанных и перечисленных ниже. Такие способы включают, но не ограничиваются ими, способы лечения возрастной макулярной дегенерации (AMD), атрофии (GA), аноксимальной ночной гемоглобинурии (PNH), отсроченной функции трансплантата (DGF), сепсиса, ревматоидного артрита (RA), мембранопролиферативного гломерулонефрита (MPGN), красной волчанки, рассеянного склероза (MS), миастении (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, респираторного дистресс-синдрома, острого воспалительного повреждения тканей, вызванного иммунным комплексом (IC), полиорганной недостаточности, болезни Альцгеймера (AD), синдрома ишемии-реперфузии, вызванного событиями или лечениями, такими как инфаркт миокарда (MI), инсульт, шунтирование сердечно-легочной артерии (CPB) или шунтирование коронарной артерии, ангиопластика или гемодиализ, хроническая обструктивная болезнь легких (COPD), идиопатический фиброз легких (IPF) и/или синдром Гийена-Барре.

Лечение заболеваний и состояний с помощью модифицированных полипептидов MTSP-1, представленных в настоящем документе, может осуществляться любым подходящим путем введения с использованием подходящих составов, как описано в настоящем документе, включая, но не ограничиваясь этим, подкожную инъекцию, пероральное, интравитреальное, периокулярное и трансдермальное введение. При необходимости конкретная дозировка, продолжительность и протокол лечения могут быть определены эмпирически или экстраполированы. Например, примерные дозы полипептидов MTSP-1 дикого типа или эталонных полипептидов можно использовать в качестве отправной точки для определения подходящих дозировок.

Модифицированные полипептиды MTSP-1, которые обладают большей специфичностью и/или селективностью по сравнению с полипептидом MTSP-1 дикого типа или эталонным полипептидом, могут быть эффективными при уменьшенной дозе или уменьшенной частоте введения. Уровни дозировки могут быть определены на основе различных факторов, таких как масса тела индивидуума, общее состояние здоровья, возраст, активность используемого конкретного соединения, пол, диета, время введения, скорость выведения, комбинация лекарств, серьезность и течение болезни, и склонность пациента к болезни и суждение лечащего врача. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалами носителя для получения единичной дозированной формы, будет варьироваться в зависимости от пациента, которого лечат, и конкретного способа введения.

При улучшении состояния пациента при необходимости можно вводить поддерживающую дозу соединения или композиций; и при этом может быть изменена

дозировка, лекарственная форма или частота введения или используемая комбинация. В некоторых случаях субъекту может потребоваться прерываемое лечение в течение длительного времени при любом повторении симптомов заболевания.

1. Заболевание, опосредованное активацией комплемента

Каскад комплемента представляет собой обоюдоострый меч, обеспечивающий защиту от бактериальной и вирусной инвазии путем стимуляции фагоцитоза и воспаления.

И наоборот, даже если комплемент функционирует нормально, он может способствовать развитию заболевания, вызывая местное воспаление и повреждение тканей. Таким образом, патологические эффекты опосредуются теми же медиаторами, которые отвечают за защитные роли комплемента. Например, анафилактический и хемотаксический пептид C5a вызывает воспаление путем рекрутирования и активации нейтрофилов, C3a может вызывать патологическую активацию других фагоцитов, а комплекс мембранной атаки может убивать или травмировать клетки. В одном примере, таком как при многих аутоиммунных заболеваниях, комплемент вызывает повреждение ткани, поскольку он активируется при неподходящих обстоятельствах, таких как антитело к тканям хозяина. В других ситуациях комплемент может активироваться нормально, например, при сепсисе, но все же способствует прогрессированию заболевания, например, при респираторном дистресс-синдроме. Патологически комплемент может вызвать существенное повреждение кровеносных сосудов (васкулит), базальной мембраны почки и прикрепленных эндотелиальных и эпителиальных клеток (нефрит), синовиального сустава (артрит) и эритроцитов (гемолиз), если он не контролируется должным образом.

Комплемент играет роль в иммунопатогенезе ряда заболеваний, включая аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит [154 – 155], красная волчанка [156 – 157] и острый гломерулонефрит [158]. Другие патологии, которые включают активацию системы комплемента, включают сепсис [159 – 160], респираторный дистресс-синдром [161 – 162], полиорганную недостаточность [163 – 164], синдром ишемии–реперфузии, который возникает при сердечно–сосудистых заболеваниях, таких как инсульт или инфаркт миокарда [165], возрастную дегенерацию желтого пятна [167 – 168] и отсроченную функцию трансплантата почки [169 – 171]. Некоторые примеры заболеваний, опосредованных комплементом, описаны ниже.

а. Ревматоидный артрит

Ревматоидный артрит (RA) – это хроническое воспалительное заболевание. Это аутоиммунное заболевание, при котором иммунная система атакует компоненты нормальной ткани, как если бы они были инвазивными патогенами. Воспаление, связанное с ревматоидным артритом, прежде всего поражает поверхность суставов. Мембраны,

выстилающие кровеносные сосуды, сердце и легкие, также могут воспаляться. RA характеризуется активированными В-клетками и плазматическими клетками, которые присутствуют в воспаленной синовиальной оболочке, а также в установленных лимфоидных фолликулах и зародышевых центрах. Это приводит к высоким уровням локальной продукции иммуноглобулина и отложению иммунных комплексов, которые могут включать ревматоидные факторы IgG и IgM, в синовиальной оболочке и в синовиальной оболочке в сочетании с суставным хрящом, который может служить инициатором каскада комплемента. В воспаленных ревматоидных суставах были обнаружены повышенные уровни компонентов комплемента, таких как C3a, C5a и C5b-9. Эти компоненты комплемента могут усугублять воспаление, связанное с RA, вызывая различные провоспалительные активности, такие как, например, изменения проницаемости сосудов, хемотаксис лейкоцитов, а также активацию и лизис нескольких типов клеток.

б. Сепсис

Сепсис – это заболевание, вызванное серьезной инфекцией, такой как бактериальная инфекция, которая приводит к системной воспалительной реакции. Компонент бактериальной клеточной стенки, липополисахарид, часто ассоциируется с сепсисом, хотя другие бактериальные, вирусные и грибковые инфекции могут стимулировать септические симптомы. Септический шок часто возникает в том случае, если естественная иммунная система организма не в состоянии защититься от вторжения микроорганизмов, так что, например, провоспалительные последствия иммунного ответа повреждают ткани хозяина. Ранние стадии сепсиса характеризуются чрезмерной активацией комплемента, приводящей к увеличению продукции анафилатоксинов комплемента, таких как C3a, C4a и C5a, которые повышают проницаемость сосудов, стимулируют выработку супероксида из нейтрофилов и стимулируют выделение гистамина. Действия C5a могут способствовать продуктивному иммунному ответу на бактериальную инфекцию, но если его не регулировать, C5a также может нанести серьезный ущерб. В модели воспаления, вызванной *E.coli*, блокада C5a улучшала исход заболевания у септических животных, ограничивая C5a-опосредованную активацию нейтрофилов, которая может привести к нейтрофильному опосредованному повреждению тканей.

Продолжающееся нарушение врожденного иммунного ответа на бактериальную инфекцию часто приводит к хроническому сепсису или септическому шоку, который может быть опасным для жизни. На поздней стадии сепсиса именно «дремлющая» активность нейтрофилов, в отличие от гиперактивности, возникающей на ранних стадиях, способствует продолжению заболевания. На поздней стадии основные функции нейтрофилов, включая хемотаксис, активность респираторного выброса и способность к

уничтожению бактерий, снижаются. Комплемент, и в частности C5a, также играет роль на поздних стадиях сепсиса. Чрезмерная продукция C5a во время сепсиса связана с «деактивацией» нейтрофилов крови, процессом, который связан с C5a-индуцированной понижающей регуляцией его собственного рецептора, C5aR, на нейтрофилах [172]. Снижение уровня C5aR на нейтрофилах коррелирует с уменьшением способности нейтрофилов крови связывать C5a, нарушением хемотаксических реакций, потерей продукции супероксида и нарушением бактерицидной активности. Однако уровни C5aR могут начать «восстанавливаться» на более поздних стадиях сепсиса и коррелировать со случаями благоприятного исхода заболевания.

в. Рассеянный склероз

Рассеянный склероз (MS) и его экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЕАЕ) на животной модели представляют собой воспалительные демиелинизирующие заболевания центральной нервной системы (ЦНС). При MS воспаление нервной ткани вызывает потерю миелина, жирового материала, который действует как своего рода защитная изоляция для нервных волокон в головном и спинном мозге. Эта демиелинизация оставляет многочисленные области рубцовой ткани (склероз) вдоль покрытия нервных клеток, что нарушает способность нервов проводить электрические импульсы в мозг и из мозга, вызывая различные симптомы рассеянного склероза. MS опосредуется активированными лимфоцитами, макрофагами/микроглией и системой комплемента. Активация комплемента может способствовать патогенезу этих заболеваний благодаря своей двойной роли: способности активированного терминального комплекса C5b-9 стимулировать демиелинизацию и способности сублитического C5b-9 защищать олигодендроциты (OLG) от апоптоза.

г. Болезнь Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера (AD) характеризуется наличием в головном мозге клубочков (аномально спаренных спиральных нитей белка тау, которые обычно связываются с микротрубочками) и бляшек (внеклеточных отложений, состоящих в основном из бета-амилоидного белка). Хотя точная причина AD не совсем ясна, хроническое нейровоспаление в пораженных областях мозга с AD указывает на то, что провоспалительные медиаторы могут играть роль в заболевании. Клубки и бляшки внутри головного мозга AD депонированы активированными фрагментами комплемента, такими как, например, C4d и C3d. Аналогично, дистрофические нейриты в мозге AD могут быть иммуноокрашены на МАК, указывая на автокаталитическую атаку этих нейритов и сопутствующую потерю нейритов при AD. Активация комплемента при AD происходит по антителозависимому механизму, индуцированному агрегированным амилоид-бета-

белком. Кроме того, каскад комплемента может активироваться пентраксинами, С-реактивным белком (СРБ) и амилоидом Р (АР), которые все активируются при АД [174]. Активация комплемента при АД, отмеченная увеличением количества медиаторов комплемента, не контролируется адекватно компенсаторной активацией регуляторных белков комплемента, таких как, например, CD59. Таким образом, провоспалительные последствия активации комплемента усугубляют прогрессирование АД и, вероятно, способствуют разрушению нейритов.

д. Синдром ишемии–реперфузии

Синдром ишемии–реперфузии представляет собой повреждение, полученное после ишемического события и последующего восстановления кровотока, и является результатом воспалительной реакции на гипоксическое повреждение. Синдром ишемии–реперфузии может быть острым, как во время операций на сердце, например, после операций на открытом сердце или ангиопластики, или хроническим, как при застойной сердечной недостаточности или окклюзионном сердечно–сосудистом заболевании.

Примеры травм, которые могут вызвать синдром ишемии–реперфузии, включают инфаркт миокарда (ИМ) и инсульт. Инициирование воспалительного ответа, вероятно, вызвано повышением уровня кислорода в тканях, которое происходит при реперфузии, и сопутствующим накоплением метаболитов, которые могут генерировать свободные радикалы кислорода, которые являются иммуностимулирующими. Синдром ишемии–реперфузии связан с множеством событий, включая тяжесть инфаркта миокарда, ишемические явления головного мозга, ишемию кишечника, а также многие аспекты сосудистой хирургии, кардиохирургии, травмы и трансплантации. Повреждение проявляется воспалительными явлениями врожденной иммунной системы, в частности активацией системы комплемента, в ответ на вновь измененную ткань, воспринимаемую как не–своя (чужая). Как таковой, синдром ишемии–реперфузии характеризуется отеком тканей, вызванным повышенной проницаемостью сосудов, и острым инфильтратом воспалительных клеток, вызванным притоком полиморфно–ядерных лейкоцитов.

Активация системы комплемента играет роль в воспалительных явлениях синдрома ишемии–реперфузии. Повреждение ишемии приводит к изменениям клеточной мембраны, влияющим на липиды, углеводы или белки внешней поверхности, так что эти открытые эпитопы изменяются и могут действовать как неоантигены (модифицированные аутоантигены). Циркулирующий IgM распознает и связывает нео–антигены с образованием иммунных комплексов на поврежденной клеточной поверхности. Образовавшиеся комплексы антиген–антитело являются классическими активаторами классического пути комплемента, хотя все пути, вероятно, так или иначе связаны с усиливающими эффектами

повреждения. Об участии классического пути комплемента в синдроме ишемии–реперфузии свидетельствуют мыши, генетически дефицитные по C3 или C4, которые демонстрируют одинаковую защиту от локального повреждения в модели травмы задней конечности и животного [165]. И наоборот, в модели почечной травмы ишемии C3–, C5– и C6–дефицитные мыши были защищены, тогда как C4–дефицитные мыши не были защищены, что указывает на важность альтернативного пути комплемента [175]. Медиаторы, индуцированные при активации комплемента, инициируют воспалительный ответ, направленный на клеточную мембрану в месте локального повреждения.

Основным эффекторным механизмом комплемента синдрома ишемии–реперфузии является приток и активация нейтрофилов в воспаленную ткань с помощью компонентов комплемента, таких как, например, C5a. Активация нейтрофилов приводит к увеличению продукции активных форм кислорода и высвобождению лизосомальных ферментов в местные поврежденные органы, что в конечном итоге приводит к апоптозу, некрозу или потере функции органа. Генерация терминального МАК, C5b–9, также способствует локальному повреждению тканей синдрома ишемии–реперфузии.

е. Нарушения зрения

В нормальном глазу система комплемента постоянно активируется на низких уровнях; мембраносвязанные и растворимые внутриглазные регуляторные белки комплемента жестко регулируют эту спонтанную активацию комплемента. Активация комплемента низкого уровня защищает от болезнетворных микроорганизмов, не вызывая повреждения собственной ткани и потери зрения. Система комплемента и регуляторные белки комплемента контролируют внутриглазное воспаление при аутоиммунном увеите и играют важную роль в развитии воспаления роговицы, возрастной дегенерации желтого пятна и диабетической ретинопатии. Система комплемента играет важную роль в патогенезе диабетической ретинопатии [175], а также диабетической невропатии и диабетического сердечно–сосудистого заболевания. Самопроизвольная активация комплемента может вызвать повреждение ткани роговицы после инфекции. Ингибирование комплемента является релевантной терапевтической мишенью при лечении различных заболеваний глаз [176].

Возрастная макулярная дегенерация (AMD)

Возрастная дегенерация желтого пятна (AMD) – это клинический термин, который описывает различные заболевания, которые характеризуются прогрессирующей потерей центрального зрения. AMD является основной причиной потери зрения у пожилых людей во многих промышленно развитых странах [177]. Потеря зрения происходит из–за прогрессирующей дегенерации желтого пятна, региона в задней части глаза, содержащей

конические фоторецепторы высокой плотности, которая специализируется на высокой остроте центрального зрения.

AMD может проявляться как сухая (неоваскулярная) и/или влажная AMD. Сухая AMD – более распространенная (85–90% случаев) и более легкая форма AMD, и она характеризуется небольшими округлыми бело–желтыми образованиями (друзами) внутри и под макулой. Более сложная сухая AMD или географическая атрофия приводит к истончению сетчатки из–за потери RPE фоторецепторов, ухудшению состояния макулы и возможной слепоте. Потеря зрения, связанная с влажной AMD, обычно более драматична, чем потеря зрения при сухой AMD, хотя и является более редкой. Влажная AMD включает образование патогенных кровеносных сосудов, называемых хориоидальной неоваскуляризацией (CNV), в которых аномальные кровеносные сосуды развиваются под слоем сетчатки пигментного эпителия сетчатки (RPE). Инвазия CNV в сетчатку из основной сосудистой оболочки через переломы в мембране Бруха, внеклеточный матрикс между сосудистой оболочкой и пигментным эпителием сетчатки (RPE), или их разрушение могут вызвать потерю зрения при AMD (например, из–за субретинального кровоизлияния и/или рубцевания).

Ранние клинические признаки AMD включают утолщение мембраны Бруха и появление друз [179], которые представляют собой внеклеточные липопротеиновые отложения, состоящие из агрегированных белков, таких как альбумин, аполипопротеин E (APOE), компоненты пути комплемента (например, фактор комплемента H(CFH), C1q, C3, C5, C5b, C6, C7, C8, C9 и витронектин [179 – 182], иммуноглобулины и/или амилоид- β [183 – 184], и липиды и клеточные компоненты, которые локализуются между RPE и мембраной Бруха. Воспаление при AMD опосредуется дерегуляцией альтернативного пути комплемента. Компоненты комплемента C3 и C5 являются основными составляющими друз у пациентов с AMD [181, 185 – 187]. Предполагается, что в биогенезе друзы участвуют хронические воспалительные процессы, которые могут вызвать активацию комплемента и образование МАК, которые могут лизировать клетки RPE или нарушать физиологический гомеостаз в клетках RPE, что приводит к характерному для AMD воспалению [188].

Белки комплемента (например, C3d) также были обнаружены в крови у пациентов с AMD [189], что указывает на то, что воспаление, вызванное AMD, может быть системным. Имеются генетические доказательства роли комплемента в патогенезе сухого AMD [190 – 191] и компстатина (и производных компстатина APL-1 и APL-2) и POT-4 (Potentia Pharmaceuticals), небольших пептидных ингибиторов C3, которые могут замедлять прогрессирование географической атрофии [192] в AMD, что указывает на то, что C3 (т.е. ингибирование C3) является жизнеспособной мишенью для лечения AMD. Недавние

клинические результаты подтвердили эти выводы и полученные сведения. C3 является жизнеспособной клинической мишенью для опосредованных комплементом расстройств и состояний или для тех, в которых комплемент принимает участие.

ж. Трансплантация органов и отсроченная функция трансплантата (DGF)

Комплемент играет роль в патогенезе синдрома ишемии–реперфузии. Механизм почечного реперфузионного повреждения зависит от генерации C5a и C5b–9, оба из которых имеют прямую токсичность для почечных канальцев, способствуя острому канальцевому некрозу и апоптозу, и приводят к острой постишемической почечной недостаточности и фиброзу тканей. В свою очередь, генерация этих компонентов терминального пути зависит от внутрипочечного синтеза C3 и доступности других компонентов комплемента, которые необходимы для активации комплемента. Уровень экспрессии C3 в донорском органе сильно зависит от времени холодной ишемии [193].

Отторжение при трансплантации твердого органа зависит от первоначального воспалительного ответа и последующего адаптивного аллоиммунного ответа, на которые влияют различные компоненты комплемента. Белки комплемента играют значительную роль в повреждении органов после трансплантации в процессе ишемии–реперфузии и в модулировании активации адаптивного иммунного ответа.

Ингибирование комплемента или модулирование функции молекул белков комплемента может уменьшить повреждение трансплантированного органа и увеличить его продолжительность жизни [193]. Назначение компонентов комплемента для терапевтического вмешательства может уменьшить повреждение органов во время восстановления, переноса и после трансплантации органов. Примером таких органов является почка.

Модифицированные полипептиды MTSP–1, представленные в настоящем документе, можно вводить для смягчения и/или лечения повреждения органов после трансплантации.

Отсроченная функция трансплантата (DGF), такая как отсроченная функция трансплантата почки, печени, легкого и/или сердца, представляет собой состояние, возникающее у подгруппы пациентов с трансплантацией органов, в которых трансплантированный орган не функционирует нормально сразу после трансплантации. Другие возможные трансплантаты включают, но не ограничиваются ими, сосудистую ткань, глаз, роговицу, хрусталик, кожу, костный мозг, мышцы, соединительную ткань, желудочно–кишечную ткань, нервную ткань, кость, стволовые клетки, островки, хрящ, гепатоциты и кроветворные клетки. Почечная DGF характеризуется острым некрозом почечного аллотрансплантата и клинически определяется необходимостью диализа вскоре

после трансплантации. Острое повреждение почек во время процесса пересадки часто проявляется как DGF. Патология, лежащая в основе DGF, является сложной, с участием донорских факторов, таких как возраст донора и продолжительность ишемии, и факторов реципиента, таких как синдром ишемии–реперфузии, иммунологические реакции и лечение иммунодепрессантами.

Компоненты каскада комплемента и активации комплемента играют критическую роль в качестве медиаторов отторжения трансплантата и синдрома ишемии–реперфузии, приводящего к DGF. Исследования на животных установили ключевую роль комплемента в синдроме ишемии–реперфузии. Например, Eculizumab, гуманизированное моноклональное антитело, направленное против C5, блокирует активацию комплемента и, как было показано, предотвращает отсроченную функцию трансплантата у подгруппы пациентов с высокой степенью риска при пересадке почки [170, 194 – 195]. Гранулярное отложение C4d было связано с DGF у реципиентов почечного аллотрансплантата человека [196]. Повышенная продукция C3 связана с отторжением трансплантата почки [197 – 198]. Следовательно, модифицированные полипептиды MTSP–1, представленные в настоящем документе, можно использовать в качестве терапевтического средства для предотвращения или ослабления или устранения отторжения трансплантата и DGF.

2. Терапевтическое применение

а. Иммуноопосредованные воспалительные заболевания

Описанные здесь модифицированные полипептиды MTSP–1 можно использовать для лечения воспалительных заболеваний. Воспалительные заболевания, которые можно лечить протеазами, включают острые и хронические воспалительные заболевания. Типичные воспалительные заболевания включают заболевания центральной нервной системы (ЦНС), аутоиммунные заболевания, состояния гиперчувствительности дыхательных путей, такие как астма, ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника и вызванное иммунным комплексом (IC) острое повреждение воспалительной ткани.

Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (EAE) может служить моделью для рассеянного склероза (MS) [199]. EAE может индуцироваться у ряда генетически восприимчивых видов путем иммунизации миелина и миелиновых компонентов, такими как миелиновый основной белок, протеолипидный белок и гликопротеин олигодендроцитов миелина (MOG). Например, MOG–индуцированный EAE повторяет основные признаки рассеянного склероза человека, включая хроническое рецидивирующее клиническое течение болезни, патогистологическую триаду воспаления, реактивный глиоз и образование больших сливных демиелинизированных бляшек.

Модифицированные полипептиды MTSP-1 могут быть оценены на животных моделях ЕАЕ. Вводят модифицированные полипептиды MTSP-1, например, ежедневными внутривенными инъекциями, и отслеживают течение и развитие симптомов по сравнению с контрольными животными. Уровни воспалительных компонентов комплемента, которые могут усугубить заболевание, также можно измерить, анализируя активность комплемента в сыворотке крови в гемолитическом анализе и анализируя отложение компонентов комплемента, таких как, например, C1, C3 и C9.

Активация комплемента модулирует воспаление при таких заболеваниях, как ревматоидный артрит (РА) [154]. Модифицированные полипептиды MTSP-1 могут быть использованы для лечения РА. Например, полипептиды MTSP-1 могут вводиться локально или системно. Модифицированные полипептиды MTSP-1 можно вводить ежедневно или еженедельно. ПЭГилированные полипептиды MTSP-1 могут быть использованы для снижения иммуногенности. В одном примере индуцированный коллагеном артрит II типа (CIA) можно индуцировать у мышей в качестве модели аутоиммунного воспалительного заболевания суставов, гистологически сходного с РА, характеризующегося воспалительным синовитом, образованием паннуса и эрозией хряща и кости. Чтобы вызвать CIA, бычий коллаген типа II (B-CII) в присутствии полного адъюванта Фрейнда может быть введен внутривенно у основания хвоста. Через 21 день мышей можно повторно иммунизировать, используя идентичный протокол. Через 3 недели после первоначального заражения B-CII, полипептид MTSP-1 или контроль можно вводить внутривенно два раза в неделю в течение 3 недель, чтобы исследовать действие полипептида MTSP-1. Мышей можно умерщвлять через 7 недель после начальной иммунизации для гистологического анализа. Чтобы оценить терапевтическое действие полипептида MTSP-1 на установленное заболевание, полипептид MTSP-1 можно вводить ежедневно в течение 10 дней после начала клинического артрита в одной или нескольких конечностях. Степень набухания в первоначально пораженных суставах можно контролировать путем измерения толщины лап с помощью штангенциркуля. В обеих моделях сыворотка может быть взята от мышей для гемолитических анализов и измерения маркеров активации комплемента, таких как, например, C5a и C5b-9. В другом примере доступными моделями для лечения РА являются модели приматов. Реакция чувствительных и опухших суставов может контролироваться у субъектов, получавших полипептиды MTSP-1 и получавших контроль, для оценки лечения полипептидом MTSP-1.

Модифицированный полипептид MTSP-1 может быть использован для лечения острого воспалительного повреждения тканей, вызванного иммунным комплексом (IC). IC-опосредованное повреждение вызвано местной воспалительной реакцией на отложение IC

в ткани. Последующий воспалительный ответ характеризуется отеком, нейтрофилией, кровоизлиянием и, наконец, некрозом тканей. IC–опосредованное повреждение ткани может быть изучено с помощью реакции Артуса *in vivo* (RPA). Вкратце, в реакции RPA избыток антитела (такого как, например, IgG кролика против альбумина куриного яйца) впрыскивают в кожу животных, таких как, например, крысы или морские свинки, которым ранее внутривенно вводили соответствующий антиген (т.е. альбумин куриного яйца) [200]. Непосредственно перед началом реакции RPA полипептид MTSP–1 или болюсный контроль можно вводить одновременно с соответствующим антигеном путем внутривенной инъекции через правую бедренную вену.

Альтернативно, полипептид MTSP–1 можно вводить в течение первого часа реакции RPA, начиная сразу после инъекции антигена и непосредственно перед дермальной инъекцией антитела. Влияние полипептида MTSP–1 на генерацию комплемент–зависимого повреждения ткани, опосредованного IC, можно оценивать в разное время после инициирования RPA путем сбора крови для определения гемолитической активности сыворотки и сбора инфицированного участка кожи для количественного определения размера поражения.

Терапевтические полипептиды MTSP–1, такие как описанные здесь, могут быть использованы для лечения сепсиса и тяжелого сепсиса, который может привести к летальному шоку. Модель опосредованного комплементом летального шока может быть использована для проверки действия полипептида MTSP–1 в качестве терапевтического агента. В одном из таких примеров крыс можно праймировать следовым количеством липополисахарида (LPS) с последующим введением моноклонального антитела против мембранного ингибитора комплемента (анти–Crry) [201]. Полипептид MTSP–1 или контроль можно вводить в любое время в течение начала летального шока, такого как перед праймированием LPS, после праймирования LPS или после введения анти–Crry, и в результате можно спасти крыс от летального шока.

6. Нейродегенеративное заболевание

Активация комплемента усугубляет прогрессирование болезни Альцгеймера (AD) и способствует потере нейритов в мозге AD. Модифицированные полипептиды MTSP–1, описанные здесь, можно использовать для лечения AD. Модели мышей, которые имитируют некоторые нейропатологические и поведенческие особенности AD, могут быть использованы для оценки терапевтического действия полипептидов MTSP–1. Примеры моделей трансгенных мышей включают введение белка–предшественника амилоида человека (APP) или белка presilin 1 (PS1) с болезнетворными мутациями у мышей под контролем агрессивного промотора. У этих мышей развиваются характеристики AD,

включая увеличение бета-амилоидных бляшек и дистрофических нейритов. Двойные трансгенные мыши для мутантных белков APP и PS1 вырабатывают большее количество фибриллярных бета-амилоидных бляшек и показывают активированные глию и факторы комплемента, связанные с бляшкой. Полипептиды MTSP-1 можно вводить, например, ежедневными внутривенными или внутривенными инъекциями, и контролировать ход и развитие симптомов по сравнению с контрольными животными.

в. Сердечно-сосудистое заболевание

Модифицированные полипептиды MTSP-1, представленные в настоящем документе, можно использовать для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Полипептиды MTSP-1 могут быть использованы при лечении сердечно-сосудистых заболеваний, включая синдром ишемии-реперфузии, возникающий в результате инсульта, инфаркта миокарда, искусственного кровообращения, шунтирования коронарной артерии, ангиопластики или гемодиализа. Полипептиды MTSP-1 также можно использовать при лечении воспалительного ответа, связанного с искусственным кровообращением, которое может способствовать повреждению ткани. Обычно полипептид MTSP-1 можно вводить до, одновременно или после лечения или события, которое вызывает опосредованный компонентом синдром ишемии-реперфузии. В одном примере полипептид MTSP-1 может быть введен субъекту до лечения субъекта с помощью опосредованного компонентом события, вызывающего ишемическое повреждение, такого как, например, шунтирование коронарной артерии при ангиопластике.

Влияние полипептида MTSP-1 на лечение синдрома ишемии-реперфузии можно оценить на животных моделях повреждения. В одной такой модели ишемия миокарда индуцируется у кроликов, у которых был сделан разрез в их переднем перикарде, путем наложения шелкового шва 3-0 вокруг левой передней нисходящей (LAD) коронарной артерии на расстоянии 5-8 мм от ее начала и ужесточения лигатуры, так что сосуд становится полностью закрытым [202]. Полипептид MTSP-1, такой как, например, модифицированный полипептид MTSP-1, или контрольный носитель, такой как физиологический раствор, можно вводить внутривенно в повышенных дозах в виде болюса через 55 минут после окклюзии коронарного русла (то есть за 5 минут до реперфузии). Спустя пять минут (т.е. после 60 минут ишемии) лигатура LAD может быть развязана, а ишемированный миокард может быть повторно перфузирован в течение 3 часов. В конце периода реперфузии лигатура вокруг LAD затягивается. Влияние полипептида MTSP-1 на повреждение при ишемии можно проанализировать, оценивая влияние на некроз миокарда, уровни креатинкиназы в плазме и маркеры активации нейтрофилов, такие как, например, активность миелопероксидазы и высвобождение супероксидных радикалов.

В другой модели опосредованного комплементом повреждения миокарда, полученного при перфузии изолированных сердец мышей буфером Кребса–Хенселейта, содержащим 6% человеческой плазмы, лечение модифицированными полипептидами MTSP–1 может использоваться для ограничения повреждения ткани сердца. В таком примере буфер, используемый для перфузии сердец, может быть дополнен различными дозами модифицированных полипептидов MTSP–1. Перфузированные сердца можно анализировать на предмет отложения человеческих C3 и C5b–9, давления перфузии коронарной артерии, конечного диастолического давления и частоты сердечных сокращений.

Модифицированные полипептиды MTSP–1, представленные в настоящем документе, можно использовать в качестве терапевтических средств до или после сердечно–легочного шунтирования (CPB) (применения аппарата АИК искусственной вентиляции легких) или шунтирования коронарной артерии для ингибирования воспалительного иммунного ответа, который часто следует за шунтом и который может способствовать повреждению ткани. Рециркуляцию цельной крови *in vitro* в экстракорпоральном шунтирующем контуре можно использовать для стимуляции изменений тромбоцитов и лейкоцитов и активации комплемента, индуцированной CPB [203]. В такой модели полипептид MTSP–1 или контрольный буфер в различных дозах можно добавлять в пакет передачи, уже содержащий кровь от здорового донора и гепарин свиньи, непосредственно перед добавлением крови в экстракорпоральный контур. Образцы крови могут быть взяты через 5, 15, 30, 45, 60, 75 и 90 минут после рециркуляции и проанализированы для исследования комплемента, например, гемолитическими анализами и/или анализами активации комплемента для измерения C5a, C3a и/или SC5b–9. Образец крови перед обработкой, взятой перед добавлением в экстракорпоральный контур, можно использовать в качестве контроля. Проточная цитометрия образцов крови может быть выполнена для определения уровней молекул адгезии в популяциях циркулирующих лейкоцитов (то есть нейтрофилов) в крови, таких как, например, уровни CD11b и P–селектина.

г. Возрастная макулярная дегенерация (AMD)

Модифицированные полипептиды MTSP–1, описанные здесь, можно использовать для лечения возрастной макулярной дегенерации (AMD). Возрастная макулярная дегенерация (AMD), которую можно лечить протеазами, включает влажную AMD, сухую AMD и географическую атрофию. Доступны многочисленные модели AMD у животных, которые имитируют многие характеристики человеческого расстройства [101]. Было показано, что мутации в генах пути комплемента увеличивают или уменьшают

восприимчивость к AMD [195, 204 – 205]. Например, в факторе комплемента Н (CFH), который обычно взаимодействует с C3b, однонуклеотидный полиморфизм Y402H предотвращает связывание C3b с фактором В, что приводит к ингибированию образования C3. Y402H связан с повышенным риском развития AMD у людей, и мутация была ранее выявлена у 43–59% пациентов с AMD [206 – 208].

Генетически модифицированные мыши, у которых отсутствует способность вызывать CFH, развивают характеристики AMD, включая аномалии сетчатки, пониженную остроту зрения и отложение комплемента [209]. Мутации в белках комплемента Факторе В [210], C2 [211] и C3 [191, 212] связаны с повышенным или пониженным риском развития AMD на основании их влияния на экспрессию и/или активность различных белков комплемента [213].

Модифицированные протеазы MTSP-1, такие как модифицированные протеазы MTSP-1, представленные в настоящем документе, с повышенной активностью, такой как субстратная специфичность или селективность, протеазы MTSP-1 для расщепления белка C3 комплемента, могут быть использованы в качестве терапевтического средства. Модифицированные полипептиды MTSP-1, представленные в настоящем документе, вводят, например, путем ежемесячной или двухмесячной интравитреальной инъекции, и отслеживают течение и прогрессирование симптомов по сравнению с контрольными животными или субъектами. Уровни компонентов комплемента, которые могут усугубить заболевание, также можно измерить, анализируя активность комплемента в сыворотке крови в гемолитическом анализе и анализируя отложение компонентов комплемента, таких как, например, C1, C3 и C9.

Активация комплемента играет роль в прогрессировании заболевания при возрастной макулярной дегенерации (AMD) [167 – 168]. Модифицированные полипептиды MTSP-1 могут быть использованы для лечения AMD. Например, полипептиды MTSP-1 или фармацевтическая композиция, содержащая полипептиды MTSP-1, такие как модифицированные полипептиды MTSP-1, описанные в настоящем документе, могут быть инъецированы интравитреально или периокулярно. Модифицированные полипептиды MTSP-1 можно вводить ежедневно, еженедельно или реже, например, ежемесячно или реже, например раз в два месяца. Для лечения AMD можно использовать модифицированные полипептиды MTSP-1 для месячного введения, которые дополнительно «модифицированы» для нахождения в глазу в течение продолжительного времени (например, слитые белки, ПЭГилированные и т. д.). Также, в зависимости от конкретной модификации, предусмотрены двухмесячная и трехмесячная дозировка (каждые 2 или каждые 3 месяца). Модифицированные полипептиды MTSP-1 могут быть

модифицированы, например, ПЭГилированием, для снижения потенциальной иммуногенности и/или увеличения периода полужизни в сыворотке. Для AMD предусмотрены модифицированные полипептиды MTSP-1, которые не подвергаются дальнейшей модификации в течение продолжительного времени в глазу (например, слитые белки, ПЭГилированные белки) при ежемесячном или двухмесячном введении. В случае модификации, такой как ПЭГилирование, дозирование может осуществляться каждые 3 месяца или более.

д. Трансплантация органа

Отсроченная функция трансплантата (DGF)

Модифицированные полипептиды MTSP-1, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения отсроченной функции трансплантата (DGF), включая DGF, такую как, например, DGF в результате синдрома ишемии–реперфузии у реципиентов трансплантата почки. Полипептиды MTSP-1 также можно использовать для лечения воспалительного ответа, связанного с трансплантацией органа, который может способствовать повреждению ткани. Обычно полипептид MTSP-1 можно вводить до, одновременно или после лечения или события, которое вызывает опосредованное комплементом возникновение синдрома ишемии–реперфузии. В одном примере полипептид MTSP-1 может быть введен субъекту до лечения субъекта с помощью опосредованного комплементом события, вызывающего ишемическое повреждение, такого как, например, пересадка почки или аллотрансплантат почки.

Влияние полипептида MTSP-1 на лечение отсроченной функции трансплантата, например, отсроченной функции трансплантата в результате синдрома ишемии–реперфузии, можно оценить на животных моделях повреждения, которые имитируют характеристики, отображаемые в аллотрансплантатах или трансплантатах почки человека.

Наличие ранних биомаркеров ранней дисфункции трансплантата, приводящих к DGF, включая биомаркеры повреждения трубчатых эпителиальных клеток, может указывать на необходимость терапии. Были идентифицированы биомаркеры DGF (то есть креатин сыворотки) [214 – 215]. Раннее обнаружение биомаркеров для DGF и терапевтического вмешательства, такого как, например, терапевтическое лечение модифицированным полипептидом MTSP-1, может улучшить клинические результаты.

Активация комплемента модулирует прогрессирование заболевания при таких нарушениях, как отсроченная функция трансплантата после трансплантации органа, например, при пересадке почки [170]. Модифицированные полипептиды MTSP-1 могут быть использованы для лечения DGF. Например, полипептиды MTSP-1 могут вводиться системно или могут быть инъецированы непосредственно в трансплантат или окружающие

ткани. Модифицированные полипептиды MTSP-1 можно вводить до, во время или после трансплантации. Модифицированные полипептиды MTSP-1 можно вводить ежедневно, еженедельно или реже, например, ежемесячно или реже, например раз в два месяца. В некоторых случаях вводят однократную системную дозу модифицированного полипептида MTSP-1. Также рассматриваются множественные инфузии модифицированного полипептида MTSP-1 в течение нескольких часов. Модифицированные полипептиды MTSP-1 могут доставляться хронически, при необходимости, например, модифицированные полипептиды MTSP-1, такие как модифицированные полипептиды MTSP-1, описанные в настоящем документе, могут доставляться ежедневно или по другому графику для поддержания эффективного количества в получателе аллотрансплантата.

Модифицированные полипептиды MTSP-1 могут быть использованы для продления выживаемости аллотрансплантата у реципиента, в частности, хронического выживания аллотрансплантата. ПЭГилированные полипептиды MTSP-1 могут быть использованы для снижения иммуногенности.

3. Комбинированная терапия

Полипептиды MTSP-1, представленные в настоящем документе, можно использовать в сочетании с другими существующими лекарственными средствами и терапевтическими агентами для лечения заболеваний и состояний. Такое лечение может проводиться в сочетании с другими противовоспалительными препаратами и/или терапевтическими агентами. Примеры противовоспалительных лекарственных средств и агентов, полезных для комбинированной терапии, включают нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID), включая салицилаты, такие как аспирин, традиционные NSAID, такие как ибупрофен, напроксен, кетпрофен, набуметон, пироксикам, диклофенак или индометацин, избирательные ингибиторы Cox-2, такие как целекоксиб (продается под торговой маркой Celebrex®) или Ротекоксин (продается под торговой маркой Vioxx®). Другие соединения, полезные в комбинированной терапии, включают антиметаболиты, такие как метотрексат и лефлуномид, кортикостероиды или другие стероиды, такие как кортизон, дексаметазон или преднизон, анальгетики, такие как ацетаминофен, аминсалицилаты, такие как месаламин, и цитотоксические агенты, такие как азатиаропин (например, уазиатиопин), циклофосфамид (продается под торговой маркой Cytoxan®) и циклоспорин А.

Дополнительные агенты, которые можно использовать в комбинированной терапии, включают модификаторы биологического ответа. Модификаторы биологического ответа могут включать провоспалительные ингибиторы цитокинов, включая ингибиторы TNF-

альфа, такие как этанерцепт (продается под торговой маркой Enbrel®), инфликсимаб (продается под торговой маркой Remicade®) или адалимумаб (продается под торговой маркой Humira®), и ингибиторы IL-1, такие как анакинра (продается под торговой маркой Kineret®). Модификаторы биологического ответа также могут включать противовоспалительные цитокины, такие как IL-10, агенты, нацеленные на В-клетки, такие как антитела против CD20 (продаются под торговой маркой Rituximab®), соединения, нацеленные на Т антигены, блокаторы молекул адгезии, антагонисты рецепторов хемокинов, ингибиторы киназы, такие как ингибиторы митоген-активируемой протеиновой (MAP) киназы, с-Jun N-концевой киназы (JNK) или ядерного фактора (NF), и лиганды гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR-γ). Дополнительные агенты, которые можно использовать в комбинированной терапии, включают иммунодепрессанты. Иммунодепрессанты могут включать такролимус или FK-506; микофеноловую кислоту; ингибиторы кальциневрина (CNI); CsA; сиролимус или другие агенты, которые, как известно, подавляют иммунную систему. Полипептиды MTSP-1, представленные в настоящем документе, также можно использовать в комбинации с агентами, которые вводят для лечения сердечно-сосудистых заболеваний и/или вводят во время процедур для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, таких как, например, описанные в настоящем документе, которые способствуют воспалительным состояниям, связанным с опосредованным комплементом синдромом ишемии-реперфузии. Например, предоставленные полипептиды MTSP-1 можно вводить в комбинации с антикоагулянтами. Примеры типичных антикоагулянтов включают, но не ограничиваются ими, гепарин, варфарин, аценокумарол, фениндион, ЭДТА, цитрат, оксалат и прямые ингибиторы тромбина, такие как аргатробан, лепирудин, бивалирудин и ксимелагатран.

Полипептиды MTSP-1, представленные в настоящем документе, также можно использовать в комбинации с агентами, которые вводят для лечения DGF. Полипептиды MTSP-1, представленные в настоящем документе, можно, например, вводить в сочетании с иммунодепрессантом. Такая комбинация полезна для продления выживаемости аллотрансплантата у реципиента, в частности, для хронической выживаемости аллотрансплантата. В предпочтительных вариантах осуществления комбинация составлена и приготовлена так, что она подходит для хронического введения реципиенту аллотрансплантата, например, используются стабильные составы. В некоторых вариантах осуществления комбинация составлена и приготовлена так, что она подходит для одновременного введения модифицированных полипептидов MTSP-1 и иммунодепрессанта реципиенту аллотрансплантата. В некоторых вариантах осуществления комбинация составлена и приготовлена таким образом, что она подходит

для последовательного (в любом порядке) введения модифицированных полипептидов MTSP-1 и иммунодепрессанта реципиенту аллотрансплантата.

Полипептиды MTSP-1, представленные в настоящем документе, также можно использовать в комбинации с агентами, которые вводят для лечения дегенерации желтого пятна. Например, модифицированные полипептиды MTSP-1 можно вводить с любым одним или несколькими из ранибизумабов (продаются под торговым названием Lucentis TM); бевацизумаб (продается под торговым названием Avastin TM); с пегаптанибом натрия (продается под торговым названием Macugen TM); афлиберцептом (продается под торговым названием Eylea TM); и вертепорфином (продается под торговым названием Visudyne TM). Для лечения дегенерации желтого пятна полипептиды MTSP-1, представленные в настоящем документе, также можно использовать в сочетании с имплантируемой телескопической трубкой, лазерным лечением или лазерной фотокоагуляцией, хирургическим вмешательством и/или фотодинамической терапией, отдельно или в сочетании с терапевтическим вертепорфином.

Дополнительные агенты, такие как другие ингибиторы комплемента, могут быть использованы в качестве противовоспалительных лекарственных средств в комбинированной терапии с модифицированными полипептидами MTSP-1, как описано в настоящем документе. Примеры таких других ингибиторов комплемента включают фактор яда кобры (CVF), полианионные молекулы, такие как гепарин, декстрансульфат, поливинилсульфат, полилизин или сурамин, природные молекулы, такие как K-76COOH, розмариновая кислота или экстракт китайской лекарственной травы эфедры, синтетические молекулы, такие как афамастат мезилат (FUT-175), синтетический ингибитор C1s (C1s-INH-248) или ингибитор C1s и fD (BCX-1470), пептидные ингибиторы, такие как компстатин, антитела-ингибиторы комплемента, такие как анти-C5 (N19-8), гуманизированные анти-C5 (h5G1.1), анти-C6 или анти-C8-антитела и растворимые формы регуляторов мембранного комплемента, такие как растворимый CR1 (sCR1), растворимый DAF (sDAF), растворимый MCP (sMCF) или растворимый CD59 (sCD59) [216].

Фармацевтические композиции, содержащие полипептиды MTSP-1, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения любого одного или нескольких из воспалительных заболеваний или состояний, опосредованных активацией комплемента. Также предоставлены комбинации полипептидов MTSP-1 и другого лечения или соединения для лечения воспалительного заболевания или состояния. Полипептиды MTSP-1 и противовоспалительный агент могут быть упакованы в виде отдельных композиций для введения вместе, последовательно или периодически. Альтернативно, они могут быть

предоставлены в виде одной композиции для введения или в виде двух композиций для введения в виде одной композиции. Комбинации могут быть упакованы в виде наборов, необязательно с дополнительными реагентами, инструкциями по применению, флаконами и другими контейнерами, шприцами и другими предметами для использования модифицированных полипептидов MTSP-1.

И. ПРИМЕРЫ

Следующие примеры включены только в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1

Клонирование и экспрессия модифицированных полипептидов MTSP-1 и скрининг модифицированных полипептидов MTSP-1, которые расщепляют СЗ в целевом сайте

А. Клонирование и мутагенез MTSP-1

Получали нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислоты 615 – 855 с заменой C122S полипептида MTSP-1 человека, указанного в SEQ ID NO: 1. Конструкция включала про-область, последовательность активации и протеазный домен и содержала аминокислотные остатки от 598 до С-конца последовательности, опубликованной в [24] и SEQ ID NO: 1 (т. е. соответствовала остаткам 598 – 855 последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 1).

Модифицированные полипептиды MTSP-1 были получены с помощью сайт-направленного мутагенеза Quikchange (Stratagene) в соответствии с инструкциями производителя со специально сконструированными олигонуклеотидами, которые служили праймерами для включения разработанных мутаций во вновь синтезированную ДНК. Вкратце, проводили ПЦР реакцию образца, содержащего в качестве матрицы MTSP-1 дикого типа и олигонуклеотидные праймеры, предназначенные для получения желаемой мутации (мутаций). После ПЦР каждый продукт реакции расщепляли DpnI для удаления метилированных исходных нитей ДНК.

Затем ДНК трансформировали в суперкомпетентные клетки *E.coli* XL-1 Blue (Stratagene) и высевали на селективный агар, содержащий 50 мкг/мл карбенициллина. Плазмидную ДНК выделяли из отобранных клонов и секвенировали для проверки включения мутации (мутаций) в желаемое местоположение (я) в гене MTSP-1 и отсутствия каких-либо дополнительных нежелательных мутаций.

Б. Получение полипептидов MTSP-1

1. Трансформация

Протеазный домен дикого типа и модифицированные полипептиды MTSP-1 (оба содержали замену C122S), как подробно описано в разделе А выше, были клонированы в

вектор экспрессии pQE-80 (Qiagen) с последующей трансформацией полученных конструкций в BL21 Gold (DE3) клетки *E.coli* (Agilent Technologies, номер по каталогу: 230132). Приблизительно 50 мкл химически компетентных клеток BL21 Gold (DE3) трансформировали подходящей плазмидной ДНК (обычно приблизительно 5 нг очищенной плазмидной ДНК или 5–10 мкл реакционной смеси для лигирования). Клетки и ДНК инкубировали на льду в течение 30 минут, подвергали тепловому шоку при 42°C в течение 45 секунд, а затем инкубировали на льду в течение 2 минут. Добавляли 450 мкл среды Terrific Broth (среда TB) (VWR International, номер по каталогу: 100219–866) комнатной температуры, и выращивали клетки в среде TB при 37°C в течение 1 часа при встряхивании при 240 об/мин. 20 мкл раствора, содержащего трансформированные клетки, распределяли по 2х YT (среда + 100 мкг/мл карбенициллина) чашкам Текнова (номер по каталогу: Y4420) и инкубировали в течение ночи при 37°C. Затем отбирали изолированные колонии и использовали их для приготовления плазмид. Полученные плазмиды подвергали секвенированию ДНК для подтверждения наличия кодирующей последовательности для желаемого полипептида MTSP-1.

2. Экспрессия полипептидов MTSP-1

Пятьсот мкл (500 мкл) ночной культуры клеток, которые были трансформированы плазмидой экспрессии pQE-80, содержащей кодирующую последовательность для желаемого полипептида MTSP-1, добавляли к 100 мл среды Terrific Broth/Carbenicillin₁₀₀, содержащей 2,1 мл Раствора 1, 5,4 мл Раствора 2 и 107 мкл Раствора 3 из Overnight Express™ Autoinduction System 1 в колбе Эрленмейера на 500 мл. Колбу помещали в мультитронный шейкер Infors, установленный на 210 об/мин. Культуру выращивали (при встряхивании) в течение ночи при 37°C. На следующее утро к культуре добавляли 20 мкл 1 М изопропил β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ; IPTG), чтобы вызвать экспрессию полипептида MTSP-1, после чего культуру выращивали при 37°C при встряхивании в течение дополнительных 2 часов. Затем «индуцированную культуру» собирали в коническую центрифужную колбу объемом 250 мл и центрифугировали при 3600 об/мин в течение 10 минут при 4°C в центрифуге Allegra™ 6R с ротором GH-3.8/GH-3.8A. Полученный клеточный осадок либо хранили при –20°C, либо сразу же обрабатывали, как описано ниже.

3. Выделение телец включения полипептида MTSP-1

Осадок бактериальных клеток из 100 мл культуры ресуспендировали в 60 мл экстракционного реагента BugBuster® (Merck Millipore, NC9591474), содержащего 60 мкл rLysozyme™ (Sigma, номер по каталогу: L6876), путем перемешивания с последующим встряхиванием при 240 об/мин в течение 1 часа при 37°C для облегчения лизиса бактерий. После лизиса бактерий нерастворимый материал осаждали центрифугированием при 3600

об/мин в течение 10 минут при 4°C и супернатант декантировали (сливали). Полученный осадок ресуспендировали путем гомогенизации в 100 мл 50 mM Трис pH 8,0 с использованием гомогенизатора Power Gen 500 (Fisher Scientific, 14–261–04P) с генератором 20 x 195 мм, используя импульсы 2 × 5 секунд, повторяемые до тех пор, пока осадок не стал хорошо диспергированным. Ресуспендированный материал центрифугировали при 3600 об/мин в течение 10 минут при 4°C, декантировали супернатант и дали осадку высохнуть на воздухе в течение 10–15 минут. Осадок телец включения (IB) взвешивали и хранили при –20°C до использования.

4. Ресуспендирование и разворачивание телец включения, содержащих полипептиды MTSP-1

Нерастворимые полипептиды MTSP-1 выделяли из телец включения (IB) и денатурировали в присутствии восстановителя. 4–5 г осадка IB ресуспендировали в 25 мл 50 mM Трис pH 8,0 путем гомогенизации с образованием раствора IB. К раствору IB добавляли 75 мл «разворачивающего» буфера (6 M GuHCl, 50 mM Трис pH 8,0 (Teknova, номер по каталогу: G0380)). Полученный раствор IB перемешивали при 240 об/мин при 37°C в течение по меньшей мере 1 часа или до полного растворения тел включения.

5. Рефолдинг полипептидов MTSP-1

Пять мл (5 мл) ресуспендированного денатурированного раствора полипептида MTSP, описанного выше, медленно по каплям добавляли в ≥ 100 мл рефолдингового буфера (1,5 M аргинина, 50 mM Трис pH 7,5, 150 mM NaCl) при разведении 1:20 или более (или приблизительно 100 мкг белка/мл рефолдингового буфера), при перемешивании. Раствор белка в рефолдинг-буфере инкубировали на шейкере при 150 об/мин в течение 24 часов при комнатной температуре, чтобы мог иметь место фолдинг (сворачивание) белка.

Полученный в результате белковый раствор переносили в диализную трубку для регенерации целлюлозы (VWR) Spectra/Por® с отсечкой молекулярной массы 12000–14000 Дальтон и диализировали в 180 л 25 mM Трис pH 8,0 в течение по меньшей мере 4 часов. На следующий день образцы переносили в новый резервуар объемом 180 л с 25 mM Трис pH 8,0 и оставляли для диализа в течение ночи. На следующий день образцы переносили в третий резервуар объемом 180 л с 25 mM Трис pH 8,0 и подвергали диализу в течение по меньшей мере 18 часов. Образцы подвергали диализу по меньшей мере в течение ночи и в течение нескольких дней. Образцы, подвергнутые диализу в течение одного дня, инкубировали при комнатной температуре, а образцы, подвергнутые диализу в течение более одного дня, инкубировали при 4°C. Отношение общего объема диализного буфера к общему объему пробы составляло не менее 100. После диализа пробы протеаз вынимали из диализной трубки и фильтровали, используя колбу объемом 500 мл и размером поры 0,22

мкм (Millipore), и была измерена проводимость раствора. Проводимость раствора была отрегулирована для предотвращения неспецифического связывания с колонкой бензамидина на стадии активации, описанной ниже. Концентрацию NaCl доводили до приблизительно 0,5 М NaCl (например, 390 мл 5 М NaCl добавляли к 3,9 л диализованного белка). Проводимость раствора должна составлять приблизительно 1,3 мСм/см.

6. Активация полипептидов MTSP-1.

После фильтрации раствора, содержащего повторно свернувшийся полипептид MTSP-1, концентрацию NaCl доводили до приблизительно 0,5 М путем добавления 5 М NaCl. Двадцать мл (20 мл) иммобилизованных шариков трипсин-агарозы поместили в одноразовую колонку Econo-Pak (Bio-Rad; номер по каталогу 7321010), после чего колонку уравнивали 200 мл (т.е. 10 объемами колонки) буфера для хроматографического раствора А (25 мМ Tris pH 8,0, 0,5 М NaCl). Раствор повторно свернувшегося (в результате рефолдинга) полипептида MTSP-1 (см. Выше) наносили на колонку и собирали прошедшие через нее фракции элюата, содержащие активированный полипептид MTSP-1. Проточные фракции, которые содержали белок, объединяли и диализовали в течение ночи в 25 мМ Трис-буфере (pH = 8,0) и дважды заменяли буфер в 150 л. Проводимость полученного в результате активированного раствора полипептида MTSP-1 была подтверждена на уровне менее 2 мСм/см или была соответствующим образом скорректирована с помощью 25 мМ Трис pH = 8,0

7. Очистка полипептидов MTSP-1.

Полипептиды MTSP-1 могут быть и были очищены в соответствии со следующими этапами:

1. Измерение проводимости активированного образца с помощью измерителя проводимости SevenEasy. Если измерение < 3 мс/см, перейдите к шагу 2 ниже. Если измерение > 3 мс/см, разбавьте образец раствором хроматографического буфера А (25 мМ Трис pH 8,0, 0,5 М NaCl) до тех пор, пока проводимость не достигнет < 3 мс/см.

2. Используя AKTAPURIFIER, загрузите образец в 5 мл катионообменную колонку HiTrap Q HP, предварительно уравновешенную 5-ю объемами колонки (CV) буфера для хроматографического раствора А со скоростью потока 8 мл/мин.

3. Вымойте колонку с 5-ю объемами колонки раствора хроматографического буфера А.

4. Элюировать 15-ю объемами колонки с градиентом 0–50% NaCl с использованием хроматографических растворов буфера А/буфера В со скоростью 5 мл/мин. Собрать 2 мл фракции.

5. Колонку промывают 3-мя объемами колонки (CV), буферным раствором для хроматографического раствора В, а затем повторно уравнивают 5 CV раствором хроматографического буфера А перед загрузкой следующего образца.

6. Активный MTSP-1 определяют с помощью анализа активности, где 5 мкл фракции смешивают с 50 мкл буфера для анализа, содержащего 200 мкл подходящей закаленной флуоресцентной подложки (добавьте субстрат QHAR QF).

7. Считайте активность на планшет-ридере Molecular Devices M5 при 30°C. Установите возбуждение на 490 нм и излучение на 520 нм.

8. Сконцентрируйте четыре наиболее активные фракции, используя 15 мл центробежный фильтр Amicon Ultra 10K.

9. Измерьте концентрацию с помощью A280 с помощью спектрофотометра Nanodrop.

Продолжайте концентрироваться до достижения приблизительной конечной концентрации 200 мкл.

10. Чтобы оценить качество очищенного продукта, загрузите 2 мкг/полосу образца в 2X буфере для образцов, содержащем 2X реагент для восстановления образцов NuPAGE, на 4–12% –ном геле NuPAGE Novex Bis–Tris. Запустите гель в IX MES Running Buffer при 200 В в течение 30 мин. Визуализируйте гель, окрашивая кумасси синим с последующим окрашиванием.

11. Быстро заморозить образец в жидком азоте и хранить при –80°C.

8. Удаление эндотоксина из очищенных полипептидов MTSP-1 для использования в моделях *in vivo*.

Удаление высокомолекулярного эндотоксина было достигнуто путем пропускания образца через 15 мл мембрану центробежного фильтра Amicon Ultra-15 100K (Fisher Scientific). Образец фильтровали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 минут. Если образец не прошел через фильтр через 20 минут, этап центрифугирования повторяли. Затем образец переносили в чистую фальконную трубку. Чтобы обеспечить полное удаление низкомолекулярного эндотоксина, образец пропускали через 2 мл Cellufine ET clean S гравитационную колонку (Fisher Scientific). По меньшей мере за 24 часа до добавления образца готовили 2 мл колонку Cellufine ET clean S. 4 мл Cellufine ET clean S суспензии и 10 мл 20% раствора этанола Endo-Free (Fisher Scientific) добавляли в хроматографическую гравитационную колонку Econo-Pac. Через колонку пропускали 20% раствор EtOH, а затем 25 мл 80% EtOH, 0,2 н NaOH. Дно гравитационной колонки закрывали и колонку заполняли 80% EtOH, 0,2 н NaOH, накрывали и инкубировали при комнатной температуре в течение по меньшей мере 16 часов. По меньшей мере, через 16

часов 80% EtOH, 0,2 н NaOH пропускали через колонку. Колонку промывали 25 мл воды, не содержащей эндотоксинов, и воде давали пройти через колонку. Затем колонку уравнивали 2 × 20 мл стерильного эндотоксин–свободного фосфатно–солевого буфера (PBS). Затем образец добавляли в колонку и затем собирали элюированный через колонку образец. Колонку промывали 10 мл эндотоксин–свободного PBS, чтобы убедиться, что образец полностью прошел через колонку.

Концентрацию белка, A_{280} , измеряли с использованием спектрофотометра NanoDrop® (NanoDrop) и с использованием теоретического коэффициента экстинкции 2,012 мг/ A_{280} . При необходимости активный белок концентрировали с использованием 15 мл Amicon Ultra–15 10K мембранных центробежных фильтровальных блоков (Fischer Scientific) примерно до 2,5 мг/мл в цитратном буферном солевом растворе (20 мМ цитрата натрия pH 5,0, 50 мМ NaCl). Для оценки качества очищенного продукта 2 мкг образца в 1х буфере для образцов NuPAGE LDS (Invitrogen, Corp.), содержащем 2х восстанавливатель образца NuPAGE (Invitrogen), загружали в 12–луночный планшет 4–12% NuPAGE Novex 4–12 % Бис–трис–гель (Invitrogen) и запускали в IX NuPAGE MES SDS запускающем буфере (Invitrogen) при 200 В в течение 30 минут. Клетку окрашивали Кумасси синим с последующим обесцвечиванием для визуализации белковых полос. Белок быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C .

В. Отбор и идентификация модифицированных полипептидов MTSP–1, которые расщепляют С3 для его инактивации

Модифицированные полипептиды MTSP–1 были идентифицированы путем скрининга библиотеки модифицированных полипептидов MTSP–1 против модифицированного серпина АТIII, как подробно описано в патенте США: US 8,211,428 (см. также публикацию США: US 2014/0242062 А1, сейчас патент US № 9,795,655). Для скрининга используют ингибирующий серпин или его фрагмент, способный образовывать промежуточное соединение ковалентного ацильного фермента между серпином и протеазой. Как правило, используется серпин, который нацелен и регулирует протеазу дикого типа *in vivo*. Однако любой серпин, который реагирует и необратимо ингибирует целевую протеазу, можно использовать в качестве «приманки» для этих экспериментов по отбору.

В этом анализе серпин, модифицированный путем замены его петли реактивного сайта (RSL) для включения последовательности–мишени (то есть сайта–мишени в С3 для расщепления до неактивного С3), захватывает модифицированные протеазы, которые расщепляют сайт–мишень с образованием стабильных комплексов. Захваченную модифицированную протеазу затем выделяют/идентифицируют. Для полипептидов MTSP–

1 серпином «приманкой» был АТIII, модифицированный путем замены указанных ниже остатков на QHARASHLG (остатки 737–745 из C3, SEQ ID NO: 9), который является целевым сайтом для инактивации человеческого C3,

«Приманка» АТIII (SEQ ID NO: 692) со вставленной последовательностью QHARASHLG, соответствующей целевому сайту C3 (остатки 737–745 SEQ ID NO: 9):

10	20	30	40	50	60
HGSPVDICTA	KPRDIPMNP	CIYRSPEKKA	TEDEGSEQKI	PEATNRRVWE	LSKANSRFAT
70	80	90	100	110	120
TFYQHLADSK	NDNDNIFLSP	LSISTAFAMT	KLACNDTLQ	QLMEVFKFDT	ISEKTSQIHF
130	140	150	160	170	180
FFFAKLNCR	LKANKSSKL	VSANRLFGDK	SLTFNETYQD	ISELVYGAKL	QPLDFKENAE
190	200	210	220	230	240
QSRAAINKWV	SNKTEGRITD	VIPSEAINEL	TVLVLVNTIY	FKGLWKSFS	PENTRKELFY
250	260	270	280	290	300
KADGESCSAS	MMYQEGKFRY	RRVAEGTQVL	ELPFKGGDDIT	MVLILPKPEK	SLAKVEKELT
310	320	330	340	350	360
PEVLQEWLDE	LEEMMLVVHM	PRFRIEDGFS	LKEQLQDMGL	VDLFSPEKSK	LPGIVAEGRD
370	380	390	400	410	420
DLYVSDAFHK	AFLEVNEEGS	EAAASTAVVQ	QHARASHLGRV	TFKANRPFLV	FIREVPLNTI
430	440				
IFMGRVANPC	VKGGGSDYKD	DDDK			

Мутации в АТIII со ссылкой на положение в SEQ ID NO: 692 суммированы следующим образом:

RCL	QHARASHLG	390	398
С-конец	GGGSDYKDDDDK	433	444
Мутация	I390Q	390	390
Мутация	A391H	391	391
Мутация	G392A	392	392
Мутация	S394A	394	394
Мутация	L395S	395	395
Мутация	N396H	396	396
Мутация	P397L	397	397
Мутация	N398G	398	398
Flag Tag	DYKDDDDK	437	444

Чтобы выполнить отбор вариантов протеаз, которые захватываются приманкой АТIII, модифицированной QHAR-ASHLG, на поверхности бактериофага M13 была показана библиотека вариантов MTSP, слитая с С-концом белка оболочки фага Р3. Несколько библиотек MTSP были разработаны путем замены природных кодонов NNK-кодонами в положениях в MTSP, предположительно важных для распознавания и расщепления субстрата на основе молекулярного моделирования, или в положениях «второй сферы», которые связываются с мутированными остатками, которые ранее были

выбраны и оказались выгодными. Эти положения соответствуют обеим, как праймированной, так и непраймированной сторонам сайта на MTSP, включая положения 40, 41, 60b, 60g, 96–99 (плюс вставки 1 и 2 аминокислот в области 96–99), 151, 175, 192, 217 и 224. Чтобы обеспечить достаточное представление для каждого варианта в фаговой библиотеке, размер каждой сконструированной библиотеки (измеренный с помощью КОЕ, сгенерированных из трансформированной библиотеки ДНК) был значительно больше, чем рассчитанное разнообразие для всех библиотек, которые содержали 5 или 6 рандомизированных положений и сравнимые с рассчитанным разнообразием для библиотек, которые содержали 7 рандомизированных положений. После создания фаговых библиотек MTSP, 96 колоний из каждой библиотеки секвенировали для подтверждения частоты и распределения мутаций и для оценки общего качества библиотеки. Высококачественные библиотеки (то есть библиотеки, содержащие ожидаемую частоту мутаций, отсутствие контаминации образцов и т. д.) затем подвергали селекции путем инкубации с множественными концентрациями биотинилированного серпина–приманки в течение различных отрезков времени. Пойманный биотинилированный–MTSP–фаг комплекс захватывали на покрытых авидином планшетах, промывали 6М гидрохлоридом гуанидина для удаления высокоаффинных нековалентных комплексов протеаза–серпин и затем элюировали DTT. В некоторых случаях был проведен обратный отбор с использованием альфа–2–макроглобулина или встречающихся в природе серпинов, таких как АТIII.

Часто отбор и встречный отбор выполняли одновременно, инкубируя библиотеку как с целевым серпином, так и с противоположным отбором серпина (ов) в одной и той же реакции. Как правило, серпин (ы) контрселекции должен присутствовать в молярном избытке по сравнению с серпином отбора. Было проведено несколько раундов селекции, затем индивидуально переросшие колонии были подвергнуты скринингу с помощью ферментного анализа на эффективность в отношении пептида, соответствующего целевому субстрату. Колонии, продуцирующие варианты с высокой активностью в отношении расщепления последовательности–мишени, дополнительно характеризовали секвенированием ДНК их фагемидной ДНК для идентификации идентичности мутаций в кодирующей последовательности MTSP–1.

Г. Модифицированные полипептиды MTSP–1

В приведенной ниже Таблице 14 представлены модификации и последовательности типичных протеазных доменов модифицированных полипептидов MTSP–1, которые были сгенерированы и отобраны для инактивации С3, причем мутации указаны с использованием нумерации зрелого полипептида MTSP–1, представленного в SEQ ID NO: 1 (нумерация

зрелого MTSP-1), а также с использованием химоотрипсиновой нумерации (дополнительные модификации приведены в таблице 15). Пока SEQ ID NOs. относятся к протеазным доменам, понятно, что мутации могут быть включены в зрелые модифицированные полипептиды MTSP-1, их каталитически активные части, которые содержат указанные модификации, и активные формы, и активированные двухцепочечные формы.

Замена C122S или другая консервативная замена S включена для устранения димеризации протеазы и снижения вероятности образования «неподходящих» дисульфидных связей во время процесса складывания; хотя это выгодно, это необязательная мутация.

Таблица 14. Модифицированные полипептиды MTSP-1.

Нумерация зрелого MTSP-1	Нумерация по химоотрипсину	SEQ ID NO.*
I640R/F706T/InsE/T707G/F708G/C731S/G759N/Q783L/Q802E	I41R/F97T/Ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	21
Q637H/I640A/D661V/F664R/Y666W/F706T/InsE/T707G/F708L/C731S/G759N/Q783L/Q802D	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	22
Q637H/I640A/D661T/F664K/Y666W/F706T/InsE/T707G/F708L/C731S/G759N/Q783L/Q802D	Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	23
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/F706D/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802E	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	24
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/F706D/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	25
Q637H/I640A/D661T/F664K/Y666W/F706T/InsE/T707G/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	26
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/F706D/InsV/T707P/F708L/C731S/G759N/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	27
Q637H/I640A/D661V/F664R/Y666W/F706T/InsE/T707G/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	28
Q637H/I640A/D661V/F664R/Y666G/D705I	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D9	29

Нумерация зрелого MTSP-1	Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO.*
/F706Y/InsN/T707G/F708L/C731S/G759N/Q783L/Q802D	61/F97Y/ins97aN/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706D/InsA/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	30
Q637H/I640A/D661V/F664R/Y666W/D705P/F706W/InsN/T707G/F708L/C731S/G759N/Q783L/Q802E	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/F97W/ins97aN/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	31
Q637H/I640A/D661V/F664R/Y666W/D705I/F706N/T707G/F708L/C731S/G759N/Q783L/Q802D	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	32
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705Y/F706E/InsV/T707G/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/F97E/ins97aV/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	33
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705L/F706D/InsG/T707G/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802E	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96L/F97D/ins97aG/T98N/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	34
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	35
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705V/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96V/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	36
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706D/InsA/T707P/F708L/C731S/G759N/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	37
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	38
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	39
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L	40
I640E/F708L/C731S/G759N/Q802T	I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T	41
I640D/C731S/G759N/Q802T	I41D/C122S/G151N/Q192T	42
I640S/F708L/C731S/G759N/Q802V	I41S/F99L/C122S/G151N/Q192V	43
I640E/F708L/C731S/G759N/Q802T	I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T	44
I640D/Y658F/D705E/F708L/C731S/G759N/Q802T	I41D/Y59F/D96E/F99L/C122S/G151N/Q192T	45
I640D/Y658F/C731S/G759N/Q802T	I41D/Y59F/C122S/G151N/Q192T	46
I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	47
Q637H/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	48
Q637H/I640S/F664S/Y666W/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	49
Q637H/I640S/D661T/Y666W/D705K/F706	Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97	50

Нумерация зрелого MTSP-1	Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO.*
G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	
Q637H/I640S/D661T/F664S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	51
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706G/T707P/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	52
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706G/InsV/F708L/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	53
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706G/InsV/T707P/C731S/G759H/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/C122S/G151H/Q175L/Q192D	54
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	55
Q637H/I640S/D661T/F664S/Y666W/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/G759H/Q802D	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q192D	56
Q637H/I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802D	Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D	57
I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q783L/Q802D	I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	58
Q637H/I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	59
I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802D	I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D	63
Q637H/I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q783L/Q802D	Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	64
Q637H/I640S/D661Y/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802D/D828V	Q38H/I41S/D60bY/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D/D217V	65
I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802D	I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V	66
Q637H/I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q783L/Q802D	I41S/D60bY/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D/D217V	67
Q637H/I640S/D661Y/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802D/D828V	I41S/D96M/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V	68
I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802D/D828V	I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192V/D217I	69
I640S/D661T/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802D/D828V	I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192H	70
I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802G/D828V	I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192N/D217V	71
I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802V/D828I	I41S/D60bY/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	72
I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802H	Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V	73
I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/Q802N/D828V	I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192V	74
I640S/D661Y/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/	I41S/P49S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V	75

Нумерация зрелого MTSP-1	Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO.*
Q783L/ Q802D		
Q637H/I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/ Q802G/ D828V	I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192N/I217V	76
I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/ Q783L/ Q802V	I41T/F97W/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192G/D217L	77
I640S/P648S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/ Q783L/ Q802G/ D828V	I41G/F97L/F99L/C122S/Q175A/Q192T/D217V	78
I640S/D705K/F706G/InsV/T707P/F708L/C731S/ Q783L/ Q802V/ D828V	I41G/F97V/F99L/C122S/G151Q/Q175M/Q192A/D217L	79
I640T/F706W/F708L/C731S/G759N/Q783M/ Q802G/ D828L	I41G/F97I/F99L/C122S/G151L/Q175M/Q192S/D217V	80
I640G/F706L/F708L/ C731S/Q783A/ Q802T/ D828V	I41G/F97S/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G/D217I	81

* SEQ ID NO домена протеазы, содержащего замены.

Пример 2

In vitro расщепление белка–комплемента C3

Активность модифицированных полипептидов MTSP–1 определяли путем расщепления субстратного белка комплемента, человеческого C3, путем измерения количества интактного человеческого C3, оставшегося после инкубации с различными концентрациями протеазы в течение 1 часа при 37°C. В этом анализе сигнал генерируется в присутствии интактного человеческого C3 и теряется при расщеплении C3.

2 мкл очищенного в плазме человеческого C3 (hC3; Complement Technologies; Tyler, TX) инкубировали с модифицированными полипептидами MTSP–1 (0–250 нМ) в течение 1 часа при 37°C в буфере, содержащем 50 мМ Трис, pH 8,0, 50 мМ NaCl и 0,01% Твин–20. Активность модифицированных полипептидов MTSP–1 гасили добавлением EGR–CMK (Haematologic Technologies, EGRCK–01) до конечной концентрации 10 мкМ, и смесь hC3/модифицированный полипептид MTSP–1 оставляли на 30 дней минут при температуре окружающей среды.

Остаточные уровни непереваренного человеческого C3 количественно определяли с использованием усиленного люминесцентного скрининга на гомогенный анализ (AlphaScreen®; Perkin Elmer), акцепторные шарики, покрытые α–мышинным IgG, при 100 мкг/мл (Perkin Elmer # 6760606) инкубировали с 5 нМ мышинным α –hC3a mAb (Abeam # ab11872–50) в 50 мМ Трис, pH 8,0, 50 мМ NaCl, 0,01% Твин–20 и 0,2% БСА для образования смеси акцепторных шариков. Смесь акцепторных шариков экранировали от света и помещали на вращающийся шейкер на 30–60 минут. Реакционные смеси hC3/модифицированного полипептида MTSP–1 (приготовленные выше) разводили в 1600 раз в 50 мМ Трис, pH 8,0, 50 мМ NaCl, 0,01% Твин–20, 0,2% БСА и 4 мкл аликвоты помещали в дубликаты лунок. 384–луночный Optiplat (Перкин Элмер # 6007299). 8 мкл

смеси α -hC3 mAb/акцепторных шариков инкубировали с 8 мкл 25 нМ биотинилированного козьего α -hC3 pAb (приготовленного с использованием набора EZ-Link Sulfo-NHS-LC-биотин от Thermo Scientific # 21327 из небитинилированной версии от Технологии дополнения № A213). Затем планшет защищали от света и инкубировали в течение 30 минут при температуре окружающей среды. После этой инкубации в каждую лунку добавляли 4 мкл донорских гранул, покрытых стрептавином, 100 мкг/мл (Perkin Elmer # 6760606) и инкубировали в течение 60 минут, экранируя от света. Альфаскринный сигнал (возбуждение = 680 нм, излучение = 570 нм) затем измеряли с использованием многолабильного планшет-ридера Envision 2104 (Perkin Elmer). Этот сигнал (соответствующий концентрации оставшегося hC3 ([hC3])) наносили на график как функцию концентрации модифицированного полипептида MTSP-1 ([Alterase]), и данные подгоняли под уравнение с четырьмя параметрами ниже, чтобы определить концентрацию модифицированного полипептида MTSP-1 (концентрация «альтеразы»), необходимую для расщепления 50% доступного hC3 (EC_{50}), наклона холма (Hill), а также максимального (Max) и минимального (Min) сигналов в анализе.

$$[hC3] = Min + \frac{Max - Min}{1 + \left(\frac{[Alterase]}{EC_{50}}\right)^{Hill}}$$

Расщепление hC3 модифицированными полипептидами MTSP-1 с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 35, измеряли независимо в общей сложности 46 раз, используя 9 различных партий протеазы. Модифицированный полипептид MTSP-1 с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 35, расщепленный белок C3 комплемента с более низким EC_{50} , чем эталонный полипептид MTSP-1, представленный в SEQ ID NO: 4, который имеет $EC_{50} = 13,9$ нМ ($n = 235$; $SD = 4,1$). Среднее значение EC_{50} для модифицированного полипептида MTSP-1 с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 35, было определено как 6,9 нМ ($n = 46$, $SD = 2,6$). Реакции расщепления C3 проводили 1–12 раз для всех других модифицированных полипептидов MTSP-1, перечисленных в таблице 15.

В таблице 15 приведены примерные модификации и EC_{50} для полипептидов, как указано в Перечне последовательностей, которые содержат эти модификации. Понятно, что в перечне последовательностей указан протеазный домен, но эти же мутации могут быть включены в полноразмерный модифицированный MTSP-1 и его различные формы и его каталитически активные формы. Как указано выше, все включают замену свободного цистеина C122S; замена уменьшает агрегацию и может быть необязательной.

Таблица 15. Расщепление hC3 модифицированными полипептидами MTSP-1.

SEQ ID NO.*	Модификации, нумерация по химотрипсину	EC ₅₀ (нМ)
4	C122S	13.9
23	Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	14.4
24	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	6.68
32	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96L/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	2.87
35	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/ins97aV/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	6.86
36	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96V/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	2.85
37	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	5.92
38	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	169
39	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	12
40	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L	1.45
42	I41D/C122S/G151N/Q192T	85.2
43	I41S/F99L/C122S/G151N/Q192V	34.4
44	I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T	124
45	I41D/Y59F/D96E/F99L/C122S/G151N/Q192T	54.9
46	I41D/Y59F/C122S/G151N/Q192T	56.7
47	I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	17.1
48	Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	215
49	Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	13.1
50	Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	8.64
51	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	22.2
52	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	7.88
53	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	9.83

SEQ ID NO.*	Модификации, нумерация по химотрипсину	EC ₅₀ (нМ)
54	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/C122S/G151H/Q175L/Q192D	18.3
55	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	5.25
56	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q192D	19.9
57	Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D	108
58	I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	68.6
59	Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	22
77	I41T/F97W/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192G/D217L	12.1
78	I41G/F97L/F99L/C122S/Q175A/Q192T/D217V	7.75
79	I41G/F97V/F99L/C122S/G151Q/Q175M/Q192A/D217L	9.74
80	I41G/F97I/F99L/C122S/G151L/Q175M/Q192S/D217V	2.84
81	I41G/F97S/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G/D217I	6.84
154	F97E/F99L/C122S/D217I/K224N	6.33
155	C122S/G193A	44.7
156	C122S/G193E	119
157	D96_F97delinsWYY/T98P/F99L/C122S	22.6
158	F97D/F99L/C122S/Q192G	78.1
159	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q192G	35.4
160	C122S/G151N/G193A	85.7
161	H40R/I41H/C122S/G151N	59.6
162	H40R/I41H/F97D/C122S/G151N	110
163	H40R/I41H/F97E/C122S	51.7
164	F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	259
165	H40R/I41H/Y60gL/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175M/D217I/K224S	7.41
166	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/G151D/Q192G	1530
167	H40R/I41H/F97D/F99L/Q192G	24.1
168	H40R/I41H/Y60gH/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175A/Q192H/D217I/K224R	19.8
169	H40R/I41H/Y60gF/F97D/F99L/C122S/Q192G/D217M/K224R	38
170	H40R/I41H/Y60gF/F97D/F99L/C122S/Q192G/D217R/K224A	25.9
171	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G/D217K/K224A	14.1
172	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192G/D217V/K224Y	2.76
173	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175K/Q192G/D217I/K224H	19.4
174	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192G/D217S	24.4
175	H40R/I41H/Y60gF/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192G/D217W/K224R	9.92
176	H40R/I41H/Y60gN/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175K/Q192S/D217S/K224L	187
177	H40R/I41H/Y60gH/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192G/D217I/K224L	3.72
178	H40K/I41L/Y60gF/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175R	237
179	H40R/I41H/Y60gL/F97D/F99L/C122S/G151N	54.9

SEQ ID NO.*	Модификации, нумерация по химотрипсину	EC ₅₀ (нМ)
180	H40K/I41M/Y60gG/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175R/Q192R/D217V/K224S	509
181	H40K/I41M/Y60gF/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	589
182	H40R/I41H/F97D/C122S/G151N/Q175M/Q192A/D217S/K224R	470
183	H40R/I41H/Y60gH/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192G/D217I/K224R	7.94
184	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/G151D/Q175M/Q192G/D217V	70.8
185	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192A/D217N/K224R	563
186	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192A/D217N/K224R	540
187	H40K/I41M/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192D/D217N/K224R	9.74
188	H40K/I41M/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192A/D217N/K224R	1290
189	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192D/D217N/K224R	9990
190	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175M/D217N/K224R	103
191	H40K/I41M/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192D/D217N/K224R	9.64
192	H40K/I41M/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192A/D217N/K224R	1230
193	H40K/I41M/F97D/F99L/C122S/Q175M/D217N/K224R	144
194	H40R/I41H/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	5860
195	H40R/I41H/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	46
196	H40R/I41H/F97E/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	82.4
197	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/G151N/Q192H	179
198	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/G151N/L153R	59.9
199	H40R/I41H/F97D/C122S/G151N/L153R/V202M	103
200	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/G151N/Q192H/P232S	262
201	H40R/I41H/F97D/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	39.7
202	H40R/I41H/F97D/C122S/G151N/L153R	126
203	H40K/I41M/F99L/C122S/T150A/G151R/Q192G	110
204	H40R/I41H/F97D/C122S/G133D/G151N	60.4
205	I41R/F99L/C122S/Q192G	53.8
206	H40R/I41H/F99L/C122S/G151K/Q192G	1520
207	I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151E/Q175L/Q192E	126
208	K86R/K110R/C122S/K134R/K157R/K224R/K239R	17.3
209	H40R/I41H/K86R/F97D/K110R/C122S/K134R/G151N/K157R/K224R/K239R	304
210	K86R/F97T/ins97aE/T98G/F99L/K110R/C122S/K134R/K157R/Q175L/Q192E/K224R/K239R	253
211	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175R/Q192G/D217H/K224S	45.2
212	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q192G/D217I/K224S	19.3
213	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q192G/D217K/K224A	23.4
214	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175R/Q192G/D217E/K224R	31.2
215	H40R/I41H/F97D/C122S/Q175R/Q192G/D217I/K224Q	93.1
216	H40P/I41R/F99L/C122S/Q192G	62.4
217	H40P/I41R/F99L/C122S/G151K/Q192G	96.1
218	H40R/I41H/F99L/C122S/G151E/Q192G	829

SEQ ID NO.*	Модификации, нумерация по химотрипсину	EC ₅₀ (нМ)
219	I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151D/Q175L/Q192E	163
220	I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151D/Q175T/Q192E	743
221	I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151D/Q175T/Q192D	1620
222	I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151E/Q175T/Q192D	1770
223	H40P/I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	442
224	H40P/I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151D/Q175L/Q192E	212
225	I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	311
226	I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	622
227	I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175T/Q192E	1410
228	I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175T/Q192D	9990
229	I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	523
230	H40P/I41R/F99L/C122S/G151E/Q192G	153
231	I41R/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151E/Q175T/Q192E	363
232	I41R/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192E	267
233	I41R/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175I/Q192E	1030
234	H40R/I41H/Y60gF/F97D/F99L/C122S/Q175K/Q192G/D217R/K224Q	93.4
235	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G/D217Q/K224R	14.9
236	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/G151N/Q192N/D217L/K224R	346
237	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/G151N/Q192H/D217K/K224A	137
238	ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/Q192G	53.5
239	F97N/ins97aT/T98Y/F99N/C122S	184
240	F97M/ins97aD/T98D/F99L/C122S/Q192T	151
241	ins97aV/F97Q/T98P/F99L/C122S/Q175F/Q192D	248
242	ins97aD/F97T/T98S/F99L/C122S/Q192E/D217Y/K224R	5000
243	ins97aN/F97H/T98D/F99L/C122S/Q192E/D217Q/K224S	2750
244	F97Q/ins97aT/T98M/C122S/Q192E/D217R/K224L	2450
245	ins97aD/F97Q/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E/D217F/K224S	5560
246	ins97aD/F97G/T98N/F99L/C122S/Q192E/D217Y/K224R	9870
247	ins97aE/F97Y/T98S/F99L/C122S/Q192T/D217Q/K224R	249
248	ins97aG/F97N/T98D/F99L/C122S/Q192E/D217H/K224A	2790
249	ins97aA/F97G/T98N/F99L/C122S/Q175M/Q192T/K224A	200
250	I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192D	2080
251	I41R/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175I/Q192D	8370
252	I41R/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151D/Q175I/Q192E	2070
253	I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151D/Q175I/Q192D	1750
254	S90T/D96A/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	280
255	Y59F/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	341
256	ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E/Q209L	383
257	Y59F/D96V/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	293
258	D96V/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	258
259	I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151S/Q175L/Q192E	274

SEQ ID NO.*	Модификации, нумерация по химотрипсину	EC ₅₀ (нМ)
260	E24K/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/A152S/Q175L/Q192D	291
261	ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/L153Q/Q175L/Q192D	332
262	ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/I136M/L155M/N170D/Q175L/Q192E	429
263	I41R/ins97aE/F97T/T98G/F99L/A112V/C122S/Q175L/Q192E	288
264	Y59F/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	289
265	Y59F/G60dS/R84H/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E/V212I	102
266	Y59F/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/L153Q/Q175L/Q192E	237
267	I41R/Y59F/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	288
268	I41R/Y59F/G60dS/R84H/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E/V212I	143
269	I41R/Y59F/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/L153Q/Q175L/Q192E	253
270	I41R/F97W/F99L/C122S/G151N/Q192G	97.3
271	F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q192G	87
272	I41D/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	157
273	I41D/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	148
274	Q38E/H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q192G	30.9
275	H40R/I41H/F97D/F99L/Q175R/Q192G/D217E/K224R	21.9
276	I41R/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q192G	232
277	ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192E	158
278	I41R/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	187
279	Q38E/H40R/I41H/D60bE/F97D/F99L/C122S/Q192G	28.1
280	Q38E/H40R/I41H/D60bN/F97D/F99L/C122S/Q192G	39.5
281	Q38E/H40R/I41H/D60bK/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G	15.3
282	Q38E/H40R/I41H/D60bN/F60eT/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G	9.42
283	Q38R/I41S/D60bH/F60eV/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	35.2
284	Q38G/H40R/I41H/D60bK/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G	20.6
285	I41D/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E/Q209L	103
286	Q38G/H40R/I41H/D60bN/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G	0.867
287	Q38R/I41S/D60bH/F60eV/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	22.5
288	H40R/I41H/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175R/Q192G/D217E/K224R	65.8
289	Q38H/I41S/D60bA/F60eV/Y60gF/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192T	7.46
290	Q38E/I41S/D60bH/F60eI/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192V	10.4
291	Q38R/I41S/D60bH/F60eI/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	27.3
292	Q38E/I41S/D60bV/F60eK/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192I	20.4
293	Q38R/I41E/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192T	63.3

SEQ ID NO.*	Модификации, нумерация по химотрипсину	EC ₅₀ (нМ)
294	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	2.37
295	Q38H/I41A/D60bA/F60eR/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	12
296	F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	194
297	ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G	38.5
298	Q38G/H40R/I41H/D60bN/F60eT/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G	11.9
299	Q38G/H40R/I41H/D60bK/F60eT/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G	21.3
300	Q38E/H40R/I41H/D60bK/F60eT/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G	16.6
301	Q38H/I41S/D60bA/F60eV/Y60gF/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192T	14.2
302	Q38E/I41S/D60bH/F60eI/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192V	11.5
303	Q38R/I41S/D60bH/F60eI/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	32.9
304	Q38E/I41S/D60bV/F60eK/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192I	19.1
305	Q38R/I41E/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192T	105
306	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	7.74
307	Q38H/I41A/D60bA/F60eR/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	14.2
308	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	29.8
309	Q38H/I41S/D60bV/F60eQ/Y60gF/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192I	5.95
310	Q38H/I41A/D60bV/F60eI/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	7.64
311	Q38H/I41A/D60bV/F60eT/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	1.39
312	Q38H/I41A/F60eA/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	5.93
313	Q38H/I41A/D60bE/F60eH/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	5.38
314	Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	3.82
315	Q38H/I41A/D60bT/F60eH/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	2.28
316	Q38H/I41S/D60bS/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	8.35
317	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	45.4
318	Q38R/I41T/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G	30.6
319	Q38S/I41S/F60eR/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192S	6.26

SEQ ID NO.*	Модификации, нумерация по химотрипсину	EC ₅₀ (нМ)
320	Q38H/I41T/D60bV/F60eQ/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	4.93
321	Q38G/H40R/I41H/D60bH/F60eK/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/V183A/Q192G	27.7
322	Q38H/I41A/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	3.9
323	Q38L/I41T/D60bR/F60eL/Y60gM/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G	23.7
324	Q38F/I41S/D60bF/F60eR/Y60gF/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192V	1.96
325	Q38V/I41S/D60bT/F60eT/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175H/Q192S	18.5
326	Q38W/I41A/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151T/Q175S/Q192D	68
327	Q38T/I41S/D60bV/F60eR/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175R/Q192V	15.7
328	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175A/Q192D	67.8
329	Q38H/I41S/D60bT/F60eT/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192V	5.08
330	Q38Y/I41A/D60bL/F60eQ/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192A	1.53
331	Q38L/I41T/D60bA/F60eL/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175M/Q192T	20.2
332	Q38R/I41S/D60bY/F60eD/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192A	3.22
333	Q38W/I41S/D60bG/F60eI/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175A/Q192D	43.1
334	Q38T/I41S/D60bG/F60eM/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192S	28.8
335	I41T/D60bW/F60eH/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G	3.1
336	Q38D/I41S/D60bT/F60eR/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151K/Q175S/Q192V	48.1
337	Q38H/I41S/D60bF/F60eV/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192A	1.57
338	Q38L/I41A/D60bH/F60eT/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151Q/Q175A/Q192G	5.73
339	Q38H/I41A/D60bE/F60eH/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	8.28
340	Q38H/I41A/D60bV/F60eI/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	2.91
341	Q38E/I41S/D60bV/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	12.1
342	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	12.6
343	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175A/Q192D	22.6

SEQ ID NO.*	Модификации, нумерация по химотрипсину	EC ₅₀ (нМ)
344	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	6.06
345	Q38H/I41A/D60bT/F60eH/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	6.95
346	D60bY/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	4.1
347	I41T/D60bY/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	3.88
348	Q38E/I41S/D60bT/F60eR/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192V	32.7
349	Q38H/I41A/D60bK/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	22.3
350	Q38H/I41S/D60bA/F60eV/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E/Q209L	16.9
351	Q38H/I41A/D60bT/F60eR/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192V	6.54
352	Q38K/I41S/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192V	43
353	Q38F/I41A/D60bT/F60eG/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	1.25
354	Q38H/I41A/F60eH/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192A	3.09
355	Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192A	2.71
356	Q38H/I41A/D60bV/F60eA/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192V	1.57
357	Q38E/I41V/D60bF/F60eK/Y60gF/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	14.2
358	Q38H/H40P/I41A/F60eQ/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	5.04
359	Q38R/I41V/D60bV/F60eV/Y60gF/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	18.3
360	Q38L/H40P/I41T/D60bV/F60eH/Y60gL/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192A	6.47
361	Q38H/I41A/D60bV/F60eH/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	5.31
362	Q38H/I41S/D60bA/F60eV/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192V	10.9
363	Q38R/I41T/D60bH/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192G	26.2
364	Q38H/I41S/D60bT/F60eR/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	15.4
365	Q38K/I41T/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192A	37.8
366	Q38H/I41A/D60bT/F60eK/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	14.6
367	Q38L/I41T/D60bV/F60eH/Y60gL/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192S	13.1
368	ins97aA/F97G/T98L/C122S/Q175M/Q192A/D217I/K224R	0.866
369	Q38H/I41A/D60bY/F60eT/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	4.77

SEQ ID NO.*	Модификации, нумерация по химотрипсину	EC ₅₀ (нМ)
370	ins97aY/F97H/F99L/C122S/Q175M/Q192A/D217V	5.72
371	ins97aL/F97Q/T98G/F99L/C122S/Q175M/Q192S/D217I	6.67
372	ins97aY/F97G/T98V/C122S/Q175M/Q192S/D217V	2.42
373	Q38Y/I41S/D60bR/F60eE/Y60gF/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192V	25
374	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192V	20.2
375	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192V	7.43
376	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175A/Q192D	22.5
377	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	6.78
378	Q38H/I41A/D60bE/F60eH/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	13.8
379	Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	10.6
380	Q38H/I41A/D60bV/F60eI/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	6.42
381	Q38E/I41S/D60bV/F60eK/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	22.9
382	Q38H/I41S/L52M/D60bG/ins97aV/F97D/T98P/F99L/M117K/C122S/I136L/Q192G/D217A	22
383	Q38E/I41A/D60bH/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/Q192G/Q209L/D217H	10.2
384	I41S/D60bT/F93L/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217H	27.7
385	I41T/D60bH/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217I	4.52
386	Q38H/I41S/D60bS/ins97aV/F97D/T98P/F99L/M117L/C122S/I136T/Q192G/D217I	2.43
387	Q38R/I41T/D60bT/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136V/Q192G/D217N/L233Q	39.8
388	Q38H/I41A/D60bW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136M/Q192G/D217N	3.06
389	Q38H/I41S/P49Q/D60bS/F93L/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217Q	48.3
390	Q38H/I41S/D60bT/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136V/Q192G/D217S	22.2
391	Q38H/I41S/D60bS/F93L/D96Y/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136F/Q192G/D217V	9.56
392	Q38H/I41T/D60bH/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136F/L153P/Q192G/D217Y	25.5
393	Q38H/I41S/D60bT/F93L/ins97aV/F97D/T98P/F99L/S115N/C122S/Q192V/F208L/D217Q	45.8
394	Q38K/I41T/D60bY/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136T/Q192G/F208V/D217R	19.5
395	Q38H/I41S/D60bS/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136V/Q192G/D217V	7.05

SEQ ID NO.*	Модификации, нумерация по химотрипсину	EC ₅₀ (нМ)
	17V	
396	Q38H/I41S/D60bG/ins97aV/F97D/T98P/F99L/M117T/C122S/N164D/Q192G/D217E	10.3
397	Q38K/I41S/D60bV/ins97aV/F97D/T98P/F99L/M117T/C122S/Q145E/Q175L/Q192G	11.8
398	Q38H/I41S/D60bT/F60eT/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192V	5.52
399	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	15.4
400	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	5.93
401	Q38H/I41S/L52M/D60bH/D96V/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/T150A/Q192G/Q209L/D217T	16.9
402	I41S/D60bS/D96V/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/Q192G/F208L/D217N	52.4
403	Q38H/I41S/D60bT/S90T/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/S127N/I136F/Q192G/D217Q	21.2
404	Q38H/I41S/D60bT/F93S/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136L/Q192G/D217A	37
405	I41S/D60bH/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136V/Q192G/D217N	20.6
406	L33M/Q38H/I41A/D60bA/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217N	50
407	Q38H/I41S/D60bY/D96Y/ins97aV/F97D/T98P/F99L/L106M/C122S/I136M/Q192G/Q209L/D217T	1.97
408	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/ins97aN/F97Y/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	2.23
409	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/ins97aA/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	7.09
410	Q38H/I41T/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/ins97aN/F97Y/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	9.75
411	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96Y/ins97aI/F97E/T98N/F99M/C122S/G151N/Q175L/Q192V	4.36
412	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96S/ins97aR/F97A/T98S/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192T	2.07
413	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	1.51
414	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	5.53
415	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/ins97aV/F97E/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	4.62
416	Q38H/I41S/D60bA/Y60gG/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/H143T/G151N/Q175L/Q192A	4.22
417	Q38H/I41S/D60bT/F60eH/Y60gF/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/H143R/G151N/Q175L/Q192S	21
418	Q38H/I41S/D60bS/F60eQ/Y60gF/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/H143R/G151N/Q175L/Q192T	12.9
419	Q38H/I41S/D60bF/F60eT/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/H143Q/G1	3.07

SEQ ID NO.*	Модификации, нумерация по химотрипсину	EC ₅₀ (nM)
	51N/Q175L/Q192G	
420	Q38H/I41S/D60bF/F60eQ/Y60gF/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/H143A/G151N/Q175L/Q192A	4.58
421	Q38H/I41S/D60bT/F60eT/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/H143Q/G151Q/Q175L/Q192G	6.69
422	Q38H/I41S/D60bQ/F60eQ/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/H143Q/G151Q/Q175L/Q192G	8.5
423	Q38H/I41S/D60bS/F60eQ/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/H143A/G151N/Q175L/Q192G	26.3
424	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96Q/F97E/ins97aD/T98S/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192R	4.6
425	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96F/F97D/ins97aE/T98S/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192A	1.17
426	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96L/ins97aG/F97D/T98N/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	1.59
427	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/ins97aV/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	6.86
428	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/ins97aN/F97Y/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	1.57
429	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	2.52
430	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	4.9
431	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/ins97aV/F97E/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	4.13
432	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	1.11
433	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	2.54
434	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	1.83
435	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97D/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	3.72
436	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	3.04
437	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97D/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	7.04
438	I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	6.33
439	Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	66.7
440	Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	3.83
441	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	3.19
442	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	25.7

SEQ ID NO.*	Модификации, нумерация по химотрипсину	EC ₅₀ (нМ)
443	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	7.82
444	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/C122S/G151H/Q175L/Q192E	11.5
445	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192E	4.86
446	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q192E	11.9
447	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L	1.31
448	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	4.07
449	Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	10.4
450	Q38H/I41S/D60bT/F60eG/Y60gW/D96V/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	4.47
451	Q38K/I41G/F60eG/Y60gW/D96P/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	62.7
452	Q38Y/I41E/D60bS/F60eV/Y60gF/D96W/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	227
453	Q38H/I41S/D60bT/F60eG/D96Y/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	9.56
454	Q38V/I41G/F60eG/Y60gW/D96P/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	27.4
455	Q38Y/I41A/D60bT/F60eG/Y60gW/D96V/F97N/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	5.06
456	Q38H/I41S/D60bT/F60eG/D96P/F97N/T98G/F99L/C122S/G151Q/Q175L/Q192D	34.2
457	Q38K/I41G/D60bT/F60eG/Y60gW/D96P/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	27.4
458	Q38K/I41G/D60bT/F60eG/Y60gW/D96L/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	12.5
459	Q38E/I41S/D60bV/F60eK/Y60gW/D96P/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	45.9
460	Q38E/I41S/D60bW/F60eG/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	22.3
461	Q38M/I41S/F60eH/Y60gW/D96Y/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	21.6
462	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97D/ins97aE/T98G/F99M/C122S/G151N/Q175L/Q192R	13.1
463	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97E/ins97aT/T98G/F99M/C122S/G151N/Q175L/Q192G	16.9
464	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97E/ins97aS/T98G/F99M/C122S/G151N/Q175L/Q192G	21.3
465	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96W/F97D/ins97aD/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G	5.28
466	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97Y/ins97aE/T98G/F99M/C	7.16

SEQ ID NO.*	Модификации, нумерация по химотрипсину	EC ₅₀ (нМ)
	122S/G151N/Q175L/Q192R	
467	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96W/F97D/ins97aT/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G	4.9
468	Q38H/I41S/D60bT/F60eK/Y60gF/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	20.6
469	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97S/ins97aH/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G	3.14
470	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97Y/ins97aN/T98G/F99M/C122S/G151N/Q175L/Q192G	3.76
471	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96F/F97S/ins97aD/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	5.17
472	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96F/F97Y/ins97aD/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	3.13
473	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/F97N/ins97aE/T98S/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	4.53
474	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/F97R/ins97aD/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	5.71
475	Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gF/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/H143R/G151N/Q175L/Q192V	24.5
476	Q38Y/I41S/D60bV/F60eR/Y60gF/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	5.25
477	Q38E/I41S/D60bV/F60eK/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	19.1
478	Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	5.12
479	Q38H/I41S/F60eT/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	35.7
480	Q38H/I41S/D60bT/F60eK/D96V/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	13.3
481	I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	9.47
482	Q38Y/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	47.7
483	Q38Y/I41S/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	10.4
484	Q38Y/I41S/D60bT/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	3.08
485	Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	16.4
486	Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	15.9
487	Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	3.27
488	Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	10.8
489	Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/C122S/G151N/Q175L/Q192D	33.6

SEQ ID NO.*	Модификации, нумерация по химотрипсину	EC ₅₀ (нМ)
490	Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q192D	56.7
491	Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L	1.08
492	Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	3.75
493	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/M117K/C122S/G151H/Q175L/Q192D	4.75
494	L36Q/Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	5.49
495	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/T150S/G151H/Q175L/Q192D/Q209L	2.88
496	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	1.43
497	I41G/F97A/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192G/D217L	47.8
498	I41G/F97S/F99L/C122S/G151N/Q175I/Q192T/D217T	84.4
499	I41R/F97A/F99L/C122S/G151N/Q175R/Q192G/D217Q	401
500	I41S/F97E/F99L/C122S/G151N/Q175G/Q192R/D217A	74.3
501	I41G/F97S/F99L/C122S/G151T/Q175R/Q192A/D217Y	52.8
502	I41G/F97L/F99L/C122S/G151N/Q175A/Q192V/D217R	34
503	I41G/F97T/F99M/C122S/G151D/Q175T/Q192T/D217V	45.6
504	I41G/F97L/F99L/C122S/G151T/Q175M/Q192D/D217M	36.8
505	F97S/F99L/C122S/G151N/Q175I/Q192T/D217T	524
506	I41G/F99L/C122S/G151N/Q175I/Q192T/D217T	108
507	I41G/F97S/C122S/G151N/Q175I/Q192T/D217T	860
508	I41G/F97S/F99L/C122S/Q175I/Q192T/D217T	155
509	I41G/F97S/F99L/C122S/G151N/Q192T/D217T	105
510	I41G/F97S/F99L/C122S/G151N/Q175I/D217T	107
511	I41G/F97S/F99L/C122S/G151N/Q175I/Q192T	97.7
512	F97R/ins97aT/T98V/C122S/Q175M/Q192T/D217S	42.2
513	F97V/ins97aH/T98R/F99L/C122S/Q175R/Q192G/D217S	905
514	F97Q/F99L/C122S/Q175N/Q192V/D217G	3670
515	F97L/ins97aM/T98N/F99L/C122S/Q175T/Q192T/D217S	256
516	F97S/ins97aN/T98G/F99M/C122S/Q175T/Q192T/D217S	2400
517	I41T/F97H/F99L/C122S/G151N/Q175H/Q192V/D217L	131
518	I41R/F97T/F99L/C122S/G151N/Q175T/Q192T/D217I	159
519	I41E/F97V/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192S/D217H	49.4
520	I41D/F97R/F99L/C122S/G151Q/Q175R/Q192V/D217L	88
521	I41E/F97R/F99L/C122S/G151Q/Q175G/Q192T/D217V	13
522	I41D/F97T/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192T/D217A	70.9
523	I41E/F97A/F99M/C122S/G151N/Q175R/Q192S/D217E	485
524	I41G/F99L/C122S/Q175I/Q192T/D217T	81.8
525	I41G/F99L/C122S/G151N/Q192T/D217T	44.7

SEQ ID NO.*	Модификации, нумерация по химотрипсину	EC ₅₀ (нМ)
526	I41G/F99L/C122S/G151N/Q175I/Q192T	51.6
527	F97V/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192S/D217H	91.6
528	I41E/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192S/D217H	27.1
529	I41E/F97V/F99L/C122S/Q175L/Q192S/D217H	44.3
530	I41E/F97V/F99L/C122S/G151N/Q192S/D217H	42.2
531	I41E/F97V/F99L/C122S/G151N/Q175L/D217H	16.5
532	I41E/F97V/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192S	51.2
533	F97R/F99L/C122S/G151Q/Q175R/Q192V/D217L	137
534	I41D/F99L/C122S/G151Q/Q175R/Q192V/D217L	31.6
535	I41D/F97R/F99L/C122S/Q175R/Q192V/D217L	50.6
536	I41D/F97R/F99L/C122S/G151Q/Q192V/D217L	42.3
537	I41D/F97R/F99L/C122S/G151Q/Q175R/D217L	19.4
538	I41D/F97R/F99L/C122S/G151Q/Q175R/Q192V	79.4
539	I41E/F97R/F99L/C122S/G151Q/Q175G/Q192T	41.1
540	I41D/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192T/D217A	30.5
541	I41D/F97T/F99L/C122S/Q175S/Q192T/D217A	52.1
542	I41D/F97T/F99L/C122S/G151N/Q192T/D217A	70.4
543	I41D/F97T/F99L/C122S/G151N/Q175S/D217A	25.5
544	I41D/F97T/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192T	56.7
545	F97T/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192T/D217A	172
546	I41S/F97Q/F99L/C122S/Q175W/Q192V/D217R	50.6
547	I41G/F97L/F99L/C122S/G151N/Q192V/D217L	112
548	I41G/F97A/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192S	73.1
549	I41G/F97V/F99L/C122S/G151N/Q192T/D217V	30.5
550	I41D/F97R/F99L/C122S/Q175L/Q192T/D217I	5.72
551	I41E/F97S/F99L/C122S/Q175L/Q192V/D217A	89.9
552	F97L/F99L/C122S/Q175K/Q192V/D217M	463
553	F97E/F99L/C122S/G151A/Q192V	1040
554	F97E/F99L/C122S/Q175H/Q192V/D217P	7770
555	F97R/ins97al/T98P/C122S/Q175M/Q192V/D217I	23.6
556	I41D/F99L/C122S/G151N/Q192T/D217A	45.1
557	I41D/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192T	28.6
558	I41D/F97T/F99L/C122S/G151N/Q192T	84.3
559	I41D/F99L/C122S/G151N/Q192T	47
560	I41D/F99L/C122S/Q175S/Q192T	27.4
561	I41D/F99L/C122S/Q192T	59.4
562	Q38R/I41G/Y60gG/F99M/C122S/G151N/Q192R	147
563	Q38K/I41G/Y60gG/F99L/C122S/G151N/Q192H	17.9
564	Q38L/I41R/Y60gF/F99L/C122S/G151N/Q192A	151
565	Q38K/I41D/Y60gG/F99L/C122S/G151N	52.7
566	Q38R/I41R/Y60gF/F99L/C122S/G151N/Q192G	197

SEQ ID NO.*	Модификации, нумерация по химотрипсину	EC ₅₀ (нМ)
567	Q38S/I41S/Y60gW/F99L/C122S/G151D/Q192T	15
568	Q38K/I41G/Y60gW/F99L/C122S/G151N/Q192A	9.96
569	Q38H/I41S/Y60gW/C122S/G151H/Q192A	8.96
570	Q38K/I41S/Y60gW/F99L/C122S/G151N/Q192G	35.1
571	Q38F/I41S/Y60gA/C122S/G151N/Q192R	33.1
572	Q38R/I41S/Y60gW/F99L/C122S/G151N/Q192E	116
573	Q38K/I41R/Y60gG/F99L/C122S/G151N/Q192G	335
574	Q38R/I41R/F99L/C122S/G151N/Q192G	248
575	Q38R/I41R/Y60gL/F99L/C122S/G151N/Q192G	388
576	I41E/C122S/G151N/Q175L/Q192A	45
577	I41S/F99M/C122S/G151N/Q175L/Q192G	62
578	I41E/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192A	28.5
579	I41S/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192V	20.9
580	I41G/F99L/C122S/G151N/Q192A	61
581	I41S/F99M/C122S/G151N/Q175G/Q192R	95.3
582	I41E/F99L/C122S/G151N/Q175R/Q192H	102
583	I41S/F99M/C122S/G151N/Q175E/Q192R	297
584	I41E/F99L/C122S/G151N/Q192V	156
585	I41E/F99L/C122S/G151N/Q192S	112
586	I41S/F99L/C122S/G151N/Q175P/Q192V	35.8
587	I41E/F99L/C122S/G151N/Q175G/Q192T	30.2
588	I41S/C122S/G151N/Q175R/Q192R	134
589	I41S/F99M/C122S/G151N/Q175P/Q192S	139
590	I41S/C122S/G151N/Q175D/Q192R	96.8
591	I41E/F99L/C122S/G151N/Q175R/Q192T	155
592	I41G/F99L/C122S/G151N/Q175R/Q192A	74.5
593	F99L/C122S/G151N/Q192T	225
594	I41D/F99L/C122S/G151N	16.9
595	I41S/F99L/C122S/Q175P/Q192V	64.3
596	I41S/F99L/C122S/G151N/Q175P	13.9
597	I41E/F99L/C122S/Q175G/Q192T	33.9
598	I41E/F99L/C122S/G151N/Q175G	20
599	I41D/Y59F/F99L/C122S/G151N/Q192T/V213A	414
600	I41D/G43A/F99L/C122S/G151N/Q192T/P232S/K239R	37.6
601	I41D/G43A/D96E/F99L/C122S/G151N/Q192T	45
602	I41D/D96E/F99L/C122S/G151N/Q192T	51.5
603	I41D/D96E/C122S/G151N/Q192T	78.8
604	I41D/D96E/F99L/C122S/G151N/Q192T/D217E	27.6
605	I41D/F99L/M117T/C122S/G151N/Q192T/A204D/D217E	25.3
606	I41D/F99L/C122S/G151N/Q192T/D217E	22
607	I41D/F99L/C122S/I136M/G151N/Q192T/D217L/K224R	32.2

SEQ ID NO.*	Модификации, нумерация по химотрипсину	EC ₅₀ (нМ)
608	I41D/F60eI/D96E/F99L/C122S/G151N/Q192T	47.9
609	I41D/C122S/G151N/Q192T/D217E	34.2
610	D96E/C122S/G151N/Q192T	298
611	Y59F/C122S/G151N/Q192T	288
612	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	7.34
613	I41S/ins97aV/C122S/Q192D	336
614	I41S/F97L/F99L/C122S/Q192S	19.1
615	I41T/F97R/ins97aV/T98L/C122S/Q192S	13.2
616	I41S/F97V/T98N/F99L/C122S/Q192S	29.4
617	I41S/F97G/ins97aA/T98L/C122S/Q192A	6.75
618	I41S/F97D/F99L/C122S/Q192V	31
619	I41E/F97L/F99L/C122S/Q192A	47.4
620	I41S/F97A/ins97aV/T98L/C122S/Q192A	5.3
621	I41S/F97del/T98S/F99L/C122S/Q192S	23.2
622	I41A/Y60gW/D96F/F97G/F99M/C122S/Q175W/Q192A	4.06
623	I41G/Y60gW/F99L/C122S/Q175R/Q192S	6.95
624	I41A/Y60gW/ins97aE/F99L/C122S/Q175M/Q192T	8.9
625	I41T/ins97aA/F99Y/C122S/Q175L/Q192A	28
626	I41A/ins97aY/F99L/C122S/Q175R/Q192H	14.8
627	I41S/ins97aT/F99L/C122S/Q175R/Q192H	27.5
628	I41S/Y60gW/ins97aN/F99L/C122S/Q175R/Q192T	12
629	Q38H/I41S/D96S/ins97aK/C122S/G151N/Q192A	16.7
630	Q38H/I41A/D96A/ins97aA/C122S/G151D/Q192T	9.25
631	Q38H/I41S/D96Q/ins97aT/C122S/G151N/Q192A	17.9
632	Q38H/I41T/D96M/ins97aA/C122S/G151D	10.8
633	Q38Y/I41A/D96I/ins97aQ/C122S	4.26
634	Q38H/I41S/D96K/ins97aT/C122S/G151K/Q192A	19.2
635	Q38W/I41S/D96R/ins97aA/C122S/G151N/Q192A	9.5
636	Q38H/I41A/D96R/ins97aQ/C122S	7.6
637	Q38F/I41V/D96Q/ins97aT/C122S/G151D	9.89
638	L33M/Q38F/I41S/D96A/ins97aW/C122S/G151N/Q192S	10.6
639	Q38H/I41S/D96V/ins97aA/C122S/G151N/Q192A	16
640	Q38H/I41T/D96K/ins97aL/C122S/G151N/Q192A	44.7
641	Q38H/I41S/D96Q/ins97aA/C122S/Q192T	10.2
642	Q38W/I41V/D96R/ins97aA/C122S/G151N	4.49
643	Q38Y/I41T/D96M/ins97aS/C122S/G151N	12.5
644	Q38H/I41S/D96K/ins97aS/C122S/G151P/Q192S	25.6
645	Q38H/I41S/D96G/ins97aG/C122S/G151N/Q192A	34.6
646	Q38H/I41S/D96K/ins97aD/C122S/G151N/Q192S	26.8
647	I41S/D96E/ins97aG/C122S/G151Q/Q192A	44.4

SEQ ID NO.*	Модификации, нумерация по химотрипсину	EC ₅₀ (нМ)
648	I41S/Y59F/ins97aV/C122S/G187D/Q192V/D217V	8.35
649	A35V/I41S/Y59F/C122S/Q192D/D217V	39.8
650	I41S/F93L/ins97aV/C122S/Q192V/D217V	9.82
651	I41S/S90P/ins97aV/C122S/Y146E/Q192N/D217V	6.47
652	I41S/S90T/ins97aV/C122S/Q192N/D217V	13.4
653	I41S/S90T/ins97aV/C122S/Q192V/D217V	10.5
654	I41S/Y59F/ins97aV/C122S/Q192G	25.6
655	I41S/Y59F/F97S/ins97aV/S116Y/C122S/Q192G/D217V	8.22
656	I41S/ins97aV/C122S/Q192G/Q209L	33.4
657	Q38H/I41S/ins97aV/A112V/C122S/Q192A/Q209L	10.9
658	I41S/ins97aV/C122S/Q192V/D217V	11
659	I41S/Y59F/ins97aV/C122S/Q192A	16.6
660	I41A/F97G/ins97aM/T98L/C122S	40.1
661	I41G/F97E/F99L/C122S/Q192A	30.1
662	I41S/F97V/ins97aV/T98P/C122S	30.9
663	I41S/T98S/F99L/C122S/Q192A	17.4
664	I41S/F97Q/F99L/C122S/Q192S	53.5
665	I41G/F97L/F99L/C122S/Q192S	41.4
666	I41S/F97G/ins97aA/T98P/C122S/Q192A	57.2
667	I41A/F97G/ins97aV/T98E/C122S	18.1
668	I41A/F97S/ins97aA/C122S	19.8
669	I41A/F97W/T98S/F99L/C122S/Q192A	27
670	I41L/N95D/D96T/F97W/F99L/C122S/Q192A	62.6
671	I41T/Y60gL/N95D/D96F/F97S/F99L/C122S/Q175S/Q192A	247
672	I41A/Y60gW/N95D/D96F/F97G/F99L/C122S/Q175H/Q192A	17.5
673	I41A/Y60gW/F99L/C122S/Q175T/Q192A	17.6
674	Q38M/I41T/D96M/ins97aH/C122S/G151E	19.1
675	Q38H/I41T/D96R/ins97aG/C122S/G151S	54.1
676	I41S/D60bY/ins97aV/T98N/C122S/Q192H	8.1
677	I41S/Y59F/D60bY/ins97aV/C122S/Q192G	5.24
678	I41S/D60bY/ins97aV/A112V/C122S/Q192G/Q209L	4.76
679	A35T/I41S/Y59F/ins97aV/C122S/Y146F/V183A/Q192G/R235H	18.4
680	I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175H/Q192D	195
681	I41S/ins97aV/C122S/N164D/Q192G/R235H	46.4
682	I41S/Y59F/ins97aV/C122S/Q192G/N223D	34.1
683	I41S/ins97aV/C122S/N164D/Q192G/R235L	49.7
684	I41S/Y59F/F97Y/ins97aV/C122S/Q192G	29.1
685	I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192V	32.3
686	I41S/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192G/D217V	3.19
687	I41S/F97L/F99L/C122S/G151N/Q192G/D217V	11.9
688	I41S/F97S/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192A/D217L	11.2

SEQ ID NO.*	Модификации, нумерация по химотрипсину	EC ₅₀ (нМ)
689	I41G/F97R/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192S/D217V	4.18
690	I41T/F97L/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192S/D217W	24.2
691	I41D/F97T/F99M/C122S/Q192V/D217M	63.8

* SEQ ID домена протеазы, содержащего замены; Понятно, что эти замены могут быть включены в полноразмерный MTSP-1 и в другие варианты, включая его каталитически активные фрагменты.

Среди них представляют интерес те, у которых EC₅₀ для расщепления hC3 составляет менее 10, такие как, но не ограничиваясь ими, например:

EC ₅₀ (нМ)	Строка мутаций	SEQ ID NO.
0.866	ins97aA/F97G/T98L/C122S/Q175M/Q192A/D217I/K224R	368
0.867	Q38G/H40R/I41H/D60bN/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G	286
1.08	Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L	491
1.11	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	432
1.17	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96F/F97D/ins97aE/T98S/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192A	425
1.25	Q38F/I41A/D60bT/F60eG/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	353
1.31	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L	447
1.39	Q38H/I41A/D60bV/F60eT/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E	311
1.43	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	496
1.45	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L	40
1.51	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	413
1.53	Q38Y/I41A/D60bL/F60eQ/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192A	330
1.57	Q38H/I41S/D60bF/F60eV/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192A	337
1.57	Q38H/I41A/D60bV/F60eA/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192V	356
1.57	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/ins97aN/F97Y/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	428
1.59	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96L/ins97aG/F97D/T98N/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	426
1.83	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	434
1.96	Q38F/I41S/D60bF/F60eR/Y60gF/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192V	324
1.97	Q38H/I41S/D60bY/D96Y/ins97aV/F97D/T98P/F99L/L106M/C122S/I136M/Q192G/Q209L/D217T	407

EC ₅₀ (нМ)	Строка мутаций	SEQ ID NO.
2.07	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96S/ins97aR/F97A/T98S/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192T	412
2.23	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/ins97aN/F97Y/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	408
2.28	Q38H/I41A/D60bT/F60eH/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	315
2.37	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	294
2.42	ins97aY/F97G/T98V/C122S/Q175M/Q192S/D217V	372
2.43	Q38H/I41S/D60bS/ins97aV/F97D/T98P/F99L/M117L/C122S/I136T/Q192G/D217I	386
2.52	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	429
2.54	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	433
2.71	Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192A	355
2.76	H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192G/D217V/K224Y	172
2.84	I41G/F97I/F99L/C122S/G151L/Q175M/Q192S/D217V	80
2.85	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96V/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	36
2.87	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	32
2.88	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/T150S/G151H/Q175L/Q192D/Q209L	495
2.91	Q38H/I41A/D60bV/F60eI/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	340
3.04	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	436
3.06	Q38H/I41A/D60bW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136M/Q192G/D217N	388
3.07	Q38H/I41S/D60bF/F60eT/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/H143Q/G151N/Q175L/Q192G	419
3.08	Q38Y/I41S/D60bT/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	484
3.09	Q38H/I41A/F60eH/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192A	354
3.1	I41T/D60bW/F60eH/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G	335
3.13	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96F/F97Y/ins97aD/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	472
3.14	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97S/ins97aH/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G	469
3.19	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	441
3.19	I41S/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192G/D217V	686
3.22	Q38R/I41S/D60bY/F60eD/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192A	332
3.27	Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	487
3.72	H40R/I41H/Y60gH/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192G/D217I/K224L	177
3.72	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97D/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	435

EC ₅₀ (нМ)	Строка мутаций	SEQ ID NO.
3.75	Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D	492
3.76	Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97Y/ins97aN/T98G/F99M/C122S/G151N/Q175L/Q192G	470
4.53	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/F97N/ins97aE/T98S/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	473
5.92	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	37
6.86	Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/ins97aV/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	35

Пример 3

Подтверждение расщепления целевого Q N A R ↓ A S H L сайта в C3

Два независимых аналитических метода были использованы для характеристики сайта (ов) расщепления C3 с помощью варианта протеазного домена MTSP-1, который содержит модификации

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D: (а) прямой анализ продуктов расщепления с помощью MALDI-MS с идентификацией высвобождаемых пептидов в диапазоне 1–40 кДа и (b) LC-тандемный МС меченого протеолитического расщепления с анализом последовательности пептидов продукта, которые содержат нео-N-конец. Эти эксперименты были выполнены следующим образом:

(а) C3 (1 мг/мл в буфере PBS) инкубировали с вариантом протеазы u-PA при соотношении фермента к субстрату 1:50 в течение всего одного часа. Образцы (50 мкл) удаляли из этих реакций через 0, 5, 10, 20, 40 и 60 минут, и реакцию расщепления прекращали в каждом образце путем добавления 1 мкл 1% TFA и мгновенного замораживания в сухом льду. Образцы затем восстанавливают с помощью 25 mM TCEP (1 ч при 37°C), затем обессоливают с помощью твердофазной экстракции C18 (Agilent Omix). Полученные продукты расщепления анализировали непосредственно с помощью MALDI-MS (ABI 4700). В каждый момент времени через 0 минут наблюдали фрагмент MW 8289 ± 1 Да, что указывает на расщепление аргинина в сайте QNAR ↓ ASHG в C3. Никаких дополнительных сайтов расщепления C3 в этих реакциях не наблюдалось.

(b) Смесь варианта C3-протеазы (10 мкл) денатурировали в 6 М гуанидине, затем боковые цепи цистеина восстанавливали (30 mM TCEP) и алкилировали (йодацетамид). Е-аминогруппу боковых цепей лизина блокировали обработкой О-метилизомочевинной (3 мкл OMU, 8 мкл 1 М NaOH, 15 мин при 65°C; гасили 2 мкл 1:1 TFA-воды с последующей очисткой SPE) и затем пептидные аминоконцы метили SulfoNHS-SS-биотином (50 mM HEPES, 250 мкМ биотиновый реагент, 30 мин при комнатной температуре). После протеолитического расщепления либо трипсином, либо Glu-C, меченные биотином

пептиды захватывались шариками авидина. Отщепление биотиновой метки было достигнуто с помощью восстановления (TCEP), давая нео-N-концевую пептидную фракцию с N-тиоацильной меткой. Эта пептидная фракция была проанализирована с помощью LC-тангема MS (Thermo LTQ-XL); основным идентифицированным C3-связанным компонентом был пептид (N-тиоацил)-ASHGLAR, что указывает на расщепление в сайте QHAR ↓ ASHG в C3.

Q H A R ↓ A S H L 737–744

P4 P3 P1 ↓ P1' P4'.

Пример 4

Фармакодинамический (ФД) анализ *ex vivo* вариантов MTSP-1 в плазме обезьян *Cynomolgus*

Расщепление C3 в антикоагулированной плазме обезьян *Cynomolgus*, обработанной EDTA, дикими типами и модифицированными полипептидами MTSP-1 измеряли, как описано ниже. ELISA C3 использовали для измерения эффективной дозы (ED_{50}) полипептидов дикого типа и модифицированных полипептидов MTSP-1, необходимых для расщепления 50% C3 в «тестовой» антикоагулированной плазме. Реакции расщепления содержали 80% плазмы, и каждую протеазу анализировали в 9 различных концентрациях в дополнение к контролю с нулевой протеазой. Самая высокая концентрация MTSP-1 дикого типа, использованная в этой реакции, составляла 6 мкл, а следующие восемь концентраций готовили путем последовательных разведений в 1,5 раза. Самая высокая концентрация, используемая для белков варианта MTSP-1, составляла 150 нМ, и, как и для белка дикого типа, следующие восемь концентраций готовили путем последовательных разведений в 1,5 раза. После добавления тест-протеазы реакционную смесь инкубировали в течение 10 минут при 37°C. Затем реакцию быстро гасили добавлением ингибитора протеазы 10 мкл EGR-CMK (Glu-Gly-Arg-хлор-этилкетон), и закаленные образцы помещали при комнатной температуре на 30 минут перед выполнением ELISA C3. Реакции расщепления разбавляли 1: 2700 в BSA-PBST, и нерасщепленный C3 «захватывали» козьим анти-huC3 (A213 CompTech) (адсорбировали на микротитровальном планшете) и «детектировали» с помощью 0,5 мкг/мл MAB anti-huC3a (Abeam abl 1872) в 1% BSA-PBST. Затем ELISA был «разработан» с использованием конъюгата Goat anti Mouse HRP и набора WesternBright Sirius Western Blotting Detection, следуя указаниям производителя.

Таблица 16: Расщепление hC3 модифицированными полипептидами MTSP-1 в плазме обезьян *Cynomolgus*.

Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO.*	ED₅₀ 80% плазмы <i>cynomolgus</i> (нМ)
Домен протеазы MTSP-1 дикого типа с C122S	4	2800
I41R/F97T/Ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	21	2200
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	22	101
Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	23	195
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	24	76
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	25	152
Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	26	136
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	27	118
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	28	133
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97Y/ins97aN/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	29	37
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	30	85
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/F97W/ins97aN/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	31	73
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	32	58
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/F97E/ins97aV/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	33	133
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96L/F97D/ins97aG/T98N/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	34	70
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	35	92
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96V/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	36	103
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	37	37

* SEQ ID домена протеазы, содержащего замены.

Пример 5

***Ex vivo* стабильность модифицированных полипептидов MTSP-1 в стекловидном теле обезьяны *Cynomolgus*.**

Стабильность *ex vivo* модифицированных полипептидов MTSP-1 оценивали в купленном стекловидном теле обезьяны *Cynomolgus* или отрицательном контроле с фосфатно-солевым буфером (PBS). Модифицированные полипептиды MTSP-1, которые проявляют стабильность при стекловидном теле, могут быть использованы для лечения AMD.

80% стекловидного тела *Cynomolgus* (получено из BioChemed; № по каталогу BC7615-V1, BC60815-V1, BC33115-V6) в буфере, содержащем 50 мМ Трис pH 8,0, 50 мМ

NaCl и 0,01% контроль Tween-20 или PBS, инкубировали с модифицированными полипептидами MTSP-1 в конечной концентрации 0,1 мкМ. Смесь инкубировали при 37°C в течение 7 дней. Остаточную протеазную активность анализировали с помощью 100 мкл флуорогенного субстрата AGR-ACC (7-амино-4-карбамоилметил-кумарин) в 50 мМ Трис pH 8,0, 50 мМ NaCl, 0,01% Твин-20, и результаты оценивали при длине волны возбуждения = 380 нм и длине волны излучения = 460 нм. Результаты показывают, что модифицированные полипептиды MTSP-1 с последовательностями, указанными в SEQ ID NO: 35, 38-40 и 47-56, проявляют сравнимую остаточную активность (то есть стабильность) после инкубации в плазме *Cynomolgus* и PBS. Результаты представлены в Таблице 17 ниже.

Таблица 17. Стабильность полипептидов MTSP-1 в стекловидном теле.

		Активность (%) на 7 день	
Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO.*	Стекло видное тело	PBS
Домен протеазы MTSP-1 дикого типа с C122S	4	59	63
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	35	92	94
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	38	73	91
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	39	77	85
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L	40	18	23
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	47	86	87
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	48	76	78
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	49	87	81
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	50	85	91
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	51	85	93
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	52	19	34
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	53	66	82
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/C122S/G151H/Q175L/Q192D	54	94	98
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	55	74	87
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q192D	56	90	94

* SEQ ID домена протеазы, содержащего замены.

Стабильность *ex vivo* модифицированных полипептидов MTSP-1 в приобретенном стекловидном теле обезьяны *Сynomolgus* через 7 и 28 дней оценивали, как указано выше. Результаты показывают, что модифицированные полипептиды MTSP-1, раскрытые в данном документе, являются относительно стабильными в течение, по меньшей мере, 7 дней в стекловидном теле. Результаты представлены в Таблице 18 ниже.

Table 18. Стабильность полипептидов MTSP-1 в стекловидном теле после 7 и 28 дней инкубации.

		Активность (%) при 37°C	
Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO.*	7 день	28 день
Домен протеазы MTSP-1 дикого типа с C122S	4	67	47
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	35	91	68
I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T	41	100	91
I41D/C122S/G151N/Q192T	42	71	35
I41S/F99L/C122S/G151N/Q192V	43	79	ND
I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T	44	91	90
I41D/Y59F/D96E/F99L/C122S/G151N/Q192T	45	85	ND
I41D/Y59F/C122S/G151N/Q192T	46	88	86
Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D	57	95	80
I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	58	96	75
Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D	59	92	63

* SEQ ID домена протеазы, содержащего замены.

Пример 6

Ex vivo фармакодинамическая активность в плазме человека

Серийные разведения модифицированных полипептидов MTSP-1 (или буфера) добавляли в плазму человека (которая содержит ~ 8 мкл эндогенного C3) для создания реакционных смесей, которые содержали 6000, 4000, 2667, 1778, 1185, 790, 527, 351, 234 или 0 нМ концентрации каждого варианта полипептида и 80% человеческой плазмы. Подобные реакционные смеси были приготовлены для MTSP дикого типа с MTSP дикого типа, присутствующим в концентрациях 150, 100, 67, 44, 30, 20, 13, 9, 6 или 0 нМ. Эти реакционные смеси инкубировали в течение 1 часа при 37°C и гасили 10 мкл EGR-CMK. Каждую реакционную смесь разводили 1:15,625 в буфере PBST, содержащем 1% BSA, и остаточную концентрацию C3 в смеси в негашеной среде «детектировали», используя mAb anti-huC3a (Abeam ab11872), и сигнал анализа «вырабатывали», используя HRP конъюгат козьего анти-мышь-HRP (JIR 115-035-003) и WesternBright Sirius Western Blotting Detection Kit. Эти данные были использованы для расчета концентрации каждого

полипептида MTSP, необходимой для расщепления 50% C3, присутствующего в плазме, в течение 1 часа инкубации (то есть ED₅₀).

Результаты представлены в Таблице 19 ниже, где приведены значения ED₅₀ (нМ) гемолиза в 80% плазме человека с помощью эталонного домена протеазы MTSP-1, включающего протеазный домен WT-MTSP-1 (дикого типа) с заменой C122S и модифицированный MTSP-1 полипептид. Как показано в Таблице 19, ED₅₀ для эталонного полипептида MTSP-1 в 80% человеческой плазме составляет 3500 нМ, тогда как типичные полипептиды MTSP-1 обладают повышенной способностью расщеплять комплемент, как указано более низким ED₅₀ (например, между 24 нМ и 835 нМ). Например, модифицированный полипептид MTSP-1 с последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 35, которая содержит замены Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, был примерно в 140 раз более эффективным, чем эталонный протеазный домен MTSP-1 с заменой C122S.

Таблица 19. Фармакодинамическая активность модифицированных полипептидов MTSP-1 в плазме человека.

Нумерация по хмотрипсину	SEQ ID NO.*	ED ₅₀ 80% плазмы человека (60 мин, нМ)
Домен протеазы MTSP-1 дикого типа с C122S	4	3500
I41R/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	21	835
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	22	52
Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	23	65
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	24	50
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	25	50
Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	26	38
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	27	41
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	28	32
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97Y/ins97aN/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	29	27
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	30	34
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/F97W/ins97aN/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	31	47
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	32	24

Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO.*	ED ₅₀ 80% плазмы человека (60 мин. нМ)
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/F97E/ins97aV/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	33	38
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96L/F97D/ins97aG/T98N/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	34	39
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	35	25
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96V/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	36	27
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	37	44

* SEQ ID домена протеазы, содержащего замены.

Пример 7

Расщепление протеиназо–активируемого рецептора 2 (PAR–2)

А. Активность мутантов в анализе на основе активированных протеиназой рецепторов 2.

MTSP–1 дикого типа является эффективным активатором PAR–2, рецептор, связанный с G–белком, экспрессируемый в эндотелиальных клетках сосудов и различных эпителиальных клетках, которые вовлечены при воспалительных заболеваниях, таких как артрит, воспаление легких (астма), воспалительные заболевания кишечника, сепсис и болевые расстройства. Снижение активности PAR–2 с помощью анти–С3–варианта полипептида MTSP–1, следовательно, увеличивает селективность С3 для этой сконструированной протеазы. Следовательно, модифицированные полипептиды MTSP–1 тестировали на их активность (то есть способность активировать) в отношении активируемого протеиназой рецептора 2 (PAR–2) в анализе на основе клеток (Millipore). ED₅₀ (нМ) расщепления PAR–2 протеазами измеряли путем построения графика расщепления фракции в зависимости от концентрации протеазы на подгонке логистической кривой с 4 параметрами (программное обеспечение SoftMax Pro, Molecular Devices, CA). Каталитически неактивная версия MTSP–1 была предоставлена в качестве отрицательного контроля.

Снижение активности PAR–2 в этом анализе (то есть более высокий ED₅₀ для расщепления PAR–2 по сравнению с MTSP–1 дикого типа) для варианта полипептида MTSP–1 указывает на то, что вариантный белок проявляет более ограниченную специфичность, чем MTSP–1 дикого типа. Повышенная специфичность по сравнению с PAR–2 указывает на то, что вариант также может демонстрировать пониженное неспецифическое расщепление других белков по сравнению с MTSP–1 дикого типа.

Результаты этих анализов (см. Таблицу 20 ниже) демонстрируют, что полипептиды проявляют значительно сниженную активность PAR-2 по сравнению с MTSP-1 дикого типа.

Другой анализ, используемый для имитации протеолитической активации PAR-2 *in vivo*, измеряет активность вариантов полипептидов MTSP-1 на закаленном пептидном субстрате флуоресценции, содержащем пептидную последовательность SKGR/SL, последовательность P4 – P2' (Ser 33 до Leu 38) активации сайта расщепления в PAR-2. Расщепление R ↓ S –сайта в этом пептидном субстрате дает сигнал флуоресценции, позволяющий измерять скорость реакции с помощью флуоресцентного планшет-ридера. Снижение активности по отношению к пептидному субстрату SKGR/SL по сравнению с MTSP-1 дикого типа указывает на то, что вариантный полипептид MTSP-1 обладает повышенной субстратной специфичностью.

Примерные результаты показаны в Таблице 20 ниже. Все протестированные модифицированные полипептиды MTSP-1 продемонстрировали как минимум 30-кратное увеличение ED₅₀ и снижение k_{cat}/K_m по сравнению с доменом протеазы MTSP-1 дикого типа с заменой C122S, указанной в SEQ ID NO: 4. Данные указывают на то, что модифицированные полипептиды MTSP-1, отобранные для расщепления C3, имеют значительно сниженную активность для нативного субстрата.

Таблица 20. Активность мутантов в анализе на основе активированных протеиназой клеток рецептора 2.

Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO.*	SKGR/SL k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)	PAR-2 анализ ED ₅₀ на основе клеток (нМ)
Домен протеазы MTSP-1 дикого типа с C122S	4	200000	1.4
I41R/F97T/Ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	21	<100	2600
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	22	925	690
Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	23	245	1900
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	24	959	1800
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	25	1730	640
Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	26	742	560
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	27	1730	n.d.
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	28	1360	430
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97Y/ins97aN/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	29	2320	450
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	30	4030	420

Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO.*	SKGR/SL k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)	PAR-2 анализ ED ₅₀ на основе клеток (нМ)
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/F97W/ins97aN/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E	31	1620	n.d.
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	32	3560	150
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/F97E/ins97aV/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	33	865	n.d.
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96L/F97D/ins97aG/T98N/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	34	1300	n.d.
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	35	6210	n.d.
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96V/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	36	4990	n.d.
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	37	2060	n.d.

* SEQ ID домена протеазы, содержащей замены.

Пример 8

Фармакокинетическая и фармакодинамическая активность при стекловидном теле обезьяны *Cynomolgus in vivo*

Фармакодинамическая активность *in vivo* в стекловидном теле (модель обезьяны *Cynomolgus*) модифицированного полипептида MTSP–1, представленного в SEQ ID NO: 35, который представляет собой протеазный домен, который содержит замены Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D. Способность расщеплять и инактивировать C3 при стекловидном теле является показателем кандидата на лечение AMD.

Двенадцать обезьян *Cynomolgus* были отнесены к одной группе лечения. Исследуемым животным внутривенно вводили однократную дозу 125 мкг модифицированного полипептида MTSP–1 в один глаз. Вводили выделенный протеазный домен, последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 35, который имеет молекулярную массу приблизительно 25 кДа. Правый глаз получил тестовое изделие, а в левый глаз вводили контрольный носитель. Четыре животных умерщвляли в каждый из следующих моментов времени: 24 часа после введения дозы, день 2 и день 6. Образцы стекловидного тела отбирали как из правого, так и из левого глаза и анализировали на стабильность модифицированного полипептида MTSP–1 и уровень C3. после лечения модифицированным полипептидом MTSP–1 или контролем с носителем; Концентрации C3 и модифицированного полипептида MTSP–1 определяли методом ELISA, как подробно описано выше.

Концентрацию модифицированного полипептида MTSP–1, присутствующего в образцах стекловидного тела, полученных через 24 часа после введения дозы и на 2–й, 6–й,

7-й и 28-й день, измеряли с помощью ELISA. Протеолитическую активность полипептидов MTSP-1 (и других сериновых протеаз) в образцах стекловидного тела гасили добавлением EGR-СМК (Haematologic Technologies, EGRCK-01) до конечной концентрации 10 мкМ, и смесь оставляли стоять в течение 30 минут при температуре окружающей среды перед проведением ELISA.

Период полураспада модифицированного полипептида MTSP-1 SEQ ID NO: 35 был определен равным приблизительно 1,7 дня, что соответствует приблизительно 5 дням в человеческой системе [217]. Восстановление *in vivo* (то есть пиковый уровень обнаруженного модифицированного полипептида MSTP-1, деленный на дозу модифицированного полипептида MTSP-1) модифицированного полипептида MTSP-1, указанного в SEQ ID NO: 35, рассчитывали с помощью ELISA из наблюдаемых максимальный уровень модифицированного полипептида MTSP-1 указан в SEQ ID NO: 35. Теоретически предсказанное значение для 100% восстановления *in vivo* составляло 2,5 мкМ. Измеренное восстановление *in vivo* протеазного домена MTSP-1 (SEQ ID NO: 35), содержащего замены Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D составляло рассчитано примерно 59% от прогнозируемого значения или примерно 1,5 мкК. Существовали значительные различия между двумя отдельными экспериментами (измерение 1 = 100%) и измерение 2 = восстановление 18%), что указывает либо на плохие интравитреальные инъекции, либо на неправильную обработку образца, хранение или разбавление и, следовательно, на неполную локальную доставку активной анти-С3-протеазы в стекловидное тело, во втором эксперименте.

Уровни С3 в стекловидном теле измеряли методом ИФА. Уровни С3 в глазу с отрицательным контролем, в который вводили носитель, находились в диапазоне от 0,4 нМ до 50 нМ (2 образца из глаз, в которые вводили носитель, значительно отличались от остальных 10, вероятно, из-за загрязнения крови во время сбора стекловидного тела иглой). Базовый уровень С3 до введения MSTP-1 составлял приблизительно 2,2 нМ. С3 не обнаруживался в глазу, обработанном вариантом, через 1, 2, 6 и 7 дней после однократной инъекции полипептида MTSP против С3. Через 28 дней после однократной инъекции концентрация С3 в глазу, обработанном модифицированным полипептидом MTSP-1, указанным в SEQ ID NO: 35, составляла приблизительно 1,4 нМ, что составляет приблизительно 64% от исходного уровня до лечения.

Результаты показывают, что модифицированный полипептид MTSP-1 каталитически удаляет С3. Период полураспада составлял 1,7 дня, согласно оценке с помощью ELISA и ферментных анализов, и подавлял витреальный комплемент по меньшей

мере или дольше, чем 7 дней. Дозы до 1 мг/глаз хорошо переносились. PK/PD моделирование указывает на подавление СЗ в течение 3 и более месяцев у людей.

Пример 9

Примерные мутации в положениях в MTSP-1

Примерные положения и мутации полипептидов MTSP-1, включая полноразмерные, предшественниковые и протеазные домены и их каталитически активные части, приведены в Таблице 21 ниже.

Таблица 21: Примерные мутации в положениях в MTSP-1.

Химотрипсиновая нумерация	Нумерация зрелого MTSP-1	WT	SEQ ID NO. 35	Примерные мутации	Консервативные мутаций
38	637	Q	H	H	N, Q
41	640	I	S	S, R, A, E, D	T, K, Q
59	658	Y		F	M, L, Y
60b	661	D	T	T, V	S, I, L
60e	664	F	S	S, R, K	T, Q, E
60g	666	Y	W	W	Y
96	705	D	K	K, V, Y, L, I, P	R, Q, E, W, F
97	706	F	G	G, T, D, E, N, Y, W	P, S, Q, H, F
Ins97a			V	V, E, A, G, N	I, L, S, P, Q, H, D
98	707	T	P	P, G, N	Q, H
99	708	F	L	L	I, V
151	759	G	H	H, N	Q
175	783	Q	L	L	I, V
192	802	Q	D	D, E	Q

Замены в любой форме MTSP-1, включая протеазный домен (SEQ ID NO: 2 или 4) и полную длину (SEQ ID NO: 1 или 3). Замены могут быть объединены, включая приведенные в качестве примера здесь, включая до 15–18 или более замен.

Пример 10

Исследования *in vivo* на безопасность, переносимость и токсичность (Cynomolgus Monkey) вариантов MTSP-1 после интравитреального введения

Безопасность и переносимость модифицированных полипептидов MTSP-1 после интравитреального введения оценивали *in vivo* у обезьян cynomolgus. Три обезьяны Cynomolgus были назначены на каждую из трех групп лечения. Исследуемым животным вводили интравитреально 12,5, 37,5 или 125 мкг на глаз каждого модифицированного полипептида MTSP-1. Правый глаз получил тестируемый полипептид, а левому глазу вводили контрольный носитель. Животных наблюдали клинически (то есть, потребление пищи) и проводили офтальмологические исследования. Офтальмологическое исследование включало биомикроскопию с использованием щелевой лампы и непрямые наблюдения за офтальмоскопом, после чего проводилась цветная фотография глазного дна или оптическая

когерентная томография (ОКТ) до введения дозы ($T = 0$) и в дни 2, 8 и 15 после введения дозы. Все наблюдения продолжались до 4 недель или до разрешения.

Уровень наблюдаемого неблагоприятного эффекта (NOAEL) оценивали для всех животных. NOAEL для животных, которым вводили модифицированный полипептид MTSP-1 с последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 42, составлял $\geq 37,5$ мкг (эквивалентно ≥ 125 мкг/глаз на человека). У животных, которым вводили модифицированный полипептид MTSP-1 с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 35, не было отмечено никаких побочных эффектов; поэтому NOAEL для животных, которым вводили модифицированный полипептид MTSP-1, представленный в SEQ ID NO: 35, составлял ≥ 125 мкг (эквивалентно ≥ 375 мкг/глаз на человека).

Пример 11

Фармакодинамическая активность, безопасность/токсичность и терапевтический индекс после внутривенного введения полипептидов MTSP-1

NOAEL после внутривенной инъекции оценивали на модели обезьян *Cynomolgus*. Самая высокая нетоксичная доза для обезьян *Cynomolgus*, которым вводили модифицированный полипептид MTSP-1, представленный в SEQ ID NO: 35, составляла ≥ 4 мг/кг. Также измеряли ED_{50} для инактивации циркулирующего C3. Активность C3 (т.е. ED_{50} для инактивации C3) для животных, которым вводили модифицированный полипептид MTSP-1, представленный в SEQ ID NO: 35, составляла 0,07 мг/кг, что было значительно ниже, чем у WT MTSP-1 (MTSP-1 дикого типа). «Терапевтический индекс» (T.I.) полипептида варианта MTSP-1 против C3 определяли как соотношение NOAEL и ED_{50} для инактивации C3 *in vivo*. Результаты представлены в Таблице 22 ниже.

Таблица 22. Фармакодинамическая активность, безопасность/токсичность и терапевтический индекс после внутривенного введения полипептидов MTSP-1.

Нумерация по химотрипсину	SEQ ID NO.	C3 расщепление, ED_{50} (мг/кг)	NOAEL (мг/кг)	Т.И.
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	22	0.2	≥ 0	NA
Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	23	0.2	≥ 4	~20
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E	24	0.1	≥ 2	~20
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97Y/ins97aN/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D	29	0.06	≥ 1	~17
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D	35	0.07	≥ 4	>57

Пример 12

Демонстрация того, что модифицированные полипептиды MTSP-1 расщепляют C3 и ингибируют активацию комплемента

А. Демонстрация ингибирующего комплемент эффекта анти-C3 протеазы (последовательность ID NO: 35) в плазме человека

1. Ингибирование *in vitro* активации комплемента в плазме человека вариабельным полипептидом MTSP-1 с последовательностью ID NO: 35.

Исследования проводились для оценки антикомплементной активности полипептида MTSP-1, модифицированного для расщепления C3 в плазме человека. Тестовым изделием в этих экспериментах, в качестве примера модифицированных полипептидов, описанных в настоящей заявке, был модифицированный полипептид MTSP-1 SEQ ID NO: 35, который является доменом протеазы, который содержит замены: Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D. Тестовое изделие (далее – тестовое изделие № 1) и экспериментальные контроли подвергали воздействию тестовой системы, объединенной цитратной плазмы.

Степень ингибирования комплемента оценивали путем измерения ингибирования стандартного классического гемолитического анализа пути (CH50). Тестируемую цитратную плазму подвергали воздействию тестируемого изделия перед анализом комплемента. Степень ингибирования комплемента представляет собой уменьшение гемолитического лизиса при тестировании функции CH50 и C3 по сравнению с таковым, наблюдаемым с контрольной (то есть необработанной) цитратной плазмой.

Функциональное тестирование позволяет анализировать специфическое ингибирование C3-компонента каскада комплемента.

2. Тестовые системы

Тестирование проводилось только с пулом цитратной плазмы человека (NHS, пул 3–5 нормальных людей).

3. Путь введения

Тестовое изделие было добавлено в тестовую систему в соотношении от одной части до девяти частей (1:9, V:V). Это соотношение поддерживает соответствующую концентрацию тест-системы, так что существует достаточная концентрация контрольных белков комплемента. Испытания проводили путем смешивания 450 мкл тестируемой системы с 50 мкл приготовленного тестируемого изделия в 1,5 мл полипропиленовой микроцентрифужной пробирке с защелкивающейся крышкой. Смесь готовили на льду, а затем встряхивали для перемешивания. Ведь экспериментальные смеси (положительные и отрицательные готовили контрольные образцы и несколько концентраций испытуемого изделия), их переносили в водяную баню с температурой 37°C ± 1°C и инкубировали в

течение 1 часа $\pm$ 10 минут. После того, как смеси инкубировали, при необходимости любые частицы удаляли центрифугированием, и все образцы аликвотировали на льду и немедленно замораживали при -70°C или ниже.

4. Тестовые описания статей

тестовое изделие	Хранение	Концентрация	Другие соображения
тестовое изделие № 1	$\leq -65^{\circ}\text{C}$	4 мг/мл 151,6 мкМ	-100 мкл предоставляется -Буфер это PBS

5. Контрольные статьи

Положительный контроль № 2	Источник	Хранение	Концентрация	Другие соображения
HAGG (Активатор Классического Пути)* 1	Exsera Biolabs	-70°C	10 мг/мл	Нет

*HAGG – активируемый теплом гамма-глобулин

Отрицательный контроль № 1	Источник	Хранение	Концентрация	Другие соображения
Физиологический раствор	Exsera Biolabs	4°C	0,9% физиологический раствор (154 мМ NaCl)	Нет

6. Контроль и подготовка тестового изделия

Были использованы пять концентраций испытуемого изделия с самым высоким уровнем при 2000 нМ. Более низкие уровни были получены при пятикратном серийном разведении.

Таблица разбавления:

Концентрация в тесте (нМ)	10х Концентрация (мкМ)	Количество запаса для/до добавления (мкл)	Какой запас	Количество физиологического раствора	Общий объем (мкл)
2000	20	30	151.6	200	230
400	4	40	20	160	200
80	0.8	40	4	160	200
16	0.16	40	0.8	160	200
3.2	0.032	40	0.16	160	200

Все разведения должны быть сделаны с физиологическим раствором, если не указано иное.

7. Дизайн эксперимента & данные

Тестирование включало пять концентраций испытуемого изделия.

Тестовое или контрольное изделие	Маркировка пробирки	Конечная концентрация (нМ, если не указано)
тестовое изделие № 1	1–А	2000
	1–В	400
	1–С	80
	1–D	16
	1–Е	3.2
Физиологический раствор	11–S	НД
Чистый (без добавок)	12–N	НД
Zymosan	13–Z	1 мг/мл
HAGG	14–H	1 мг/мл

8. Результаты

Тестовое или контрольное изделие	Маркировка пробирки	Конечная концентрация (нМ, если не указано)	Данные Ед/мл	% Ингибирования
тестовое изделие № 1	1–А	2000	5.56	92%
	1–В	400	10.84	84%
	1–С	80	41.45	40%
	1–D	16	68.97	1%
	1–Е	3.2	72.98	–5%
Физиологический раствор	S	НД	69.32	
HAGG	H	1 мг/мл	8.16	

Эти данные демонстрируют, что эффективность полипептида анти–С3 MTSP–1 (SEQ ID NO: 35) ингибирует активность комплемента в плазме человека с 40% ингибированием, наблюдаемым при «дозе» 80 нМ варианта анти–С3 MTSP–1 (SEQ ID NO: 35) и почти полное ингибирование (т.е. 94%), наблюдаемое при самой высокой дозе полипептида MTSP–1, использованной в исследованиях.

В. Демонстрация того, что расщепление в месте QHAR/ASHL инактивирует человеческий С3

Чтобы подтвердить, что ингибирование комплемента тестируемым изделием № 1 (полипептид MTSP–1 с SEQ ID NO: 35), продемонстрированное выше, опосредовано расщеплением С3 в сайте QHAR/ASHL, был проведен эксперимент, описанный ниже.

1. Краткий дизайн эксперимента

Анализ функции комплемента проводили с сывороточным дефицитом C3 (приобретен у Complement Technologies; каталог № A314). C3 (также приобретенный у Complement Technologies; каталог № A113) добавляли обратно в сыворотку с предварительной инкубацией и без нее с композицией, содержащей тестируемое изделие № 1 (модифицированный полипептид MTPS-1 SEQ ID NO: 35). Степень, до которой предварительная инкубация с тестовым продуктом № 1 ингибирует функцию комплемента, отражает уровень ингибирования C3.

2. Описание очищенного реагента C3

Нормальная концентрация C3 в сыворотке человека составляет ~ 1 мг/мл. Концентрация C3 от Complement Technologies составляет 1,1 мг/мл. C3 добавляли в обесеченную C3 сыворотку в разведении 1/50.

3. Описание испытательного изделия

Тестовое изделие	Хранение	Концентрация	Другие соображения
Тестовое изделие #1	$\leq -65^{\circ}\text{C}$	4 мг/мл 151,6 мкМ	–100 мкл предоставляется –Буфер это PBS

4. Органы управления

Положительный контроль #2	Источник	Концентрация
HAGG (Активатор Классического Пути)*	Exsera Biolabs	10 мг/мл

*HAGG – активируемый теплом гамма-глобулин

Отрицательный контроль #1	Источник	Концентрация
Физиологический раствор	Exsera Biolabs	0,9% физиологический раствор (154 ммоль NaCl)

HAGG (Активатор Классического Пути)*

5. Подготовка контрольного и тестового изделия

Таблица разбавления

Концентрация в тесте (нМ)	10х Концентрация (мкМ)	Количество запаса для/до добавления (мкл)	Какой запас	Количество физиологического раствора	Общий объем (мкл)
2000	20	30	151.6	200	230
400	4	40	20	160	200
80	0.8	40	4	160	200
16	0.16	40	0.8	160	200
3.2	0.032	40	0.16	160	200

Все разведения сделаны с физиологическим раствором, если не указано иное.

6. Дизайн эксперимента: условия испытаний 1 и 2

Условие испытания 1:

Компоненты (пробирка 1 и пробирка 2) инкубировали отдельно в течение 2 часов при 37°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Пробирка 1 содержала 100 мкл СЗ, а пробирка 2 содержала 25 мкл испытуемого изделия (ТА, полипептид MTSP-1 или физиологический раствор). Образцы замораживали при -80°C или ниже до испытания в СЗН50 с обедненной сывороткой. Каждую пробирку инкубировали при 37°C в течение 2 часов.

90 мкл СЗ из пробирки 1 объединяли с 10 мкл (ТА, полипептид или физиологический раствор) из пробирки 2, затем смешивали и немедленно замораживали при 80°C ; без предварительного расщепления СЗ ТА перед добавлением к СЗН50 при разведении 1/50.

Условие испытания 2:

Компоненты смешивали в пробирке 3 (90 мкл СЗ и 10 мкл ТА, легкий вихрь) и инкубировали в течение 2 часов (предварительное расщепление СЗ на сайте QHAR (остатки 737–740 SEQ ID NO: 9) при 37°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), немедленно замораживают и добавляют к СЗН50 в 1/50.

Тестовое или контрольное изделие	Маркировка пробирки	Очищенный СЗ (Да/Нет)	Тестовое состояние	Конечная концентрация в Тестовом состоянии (нМ, если не указано)	Ожидаемый результат
Только солевой раствор	S	Н	Тестовое состояние #1	НД	Ноль СЗН50
Физиологический раствор	SC	Д	Тестовое состояние #2	НД	Полный СЗН50
Тестовое изделие #1	1–А	Д	Тестовое состояние #1	200	Полный СЗН50 или слегка ингибированный
	1–В	Д		40	
	1–С	Д		8	
Тестовое изделие #1	2–А	Д	Тестовое состояние #2	200	Низкое СЗН50 обратно пропорционально концентрации ТА
	2–В	Д		40	
	2–С	Д		8	
Чистый (без добавок)	N	Н	Тестовое состояние #1	НД	
Zymosan	Z	Н	Тестовое состояние #1	1 мг/мл	
HAGG	H	Н	Тестовое состояние #1	1 мг/мл	

7. Считывание активации или ингибирования компонента

Модифицированная гемолитическая функция C3H50. C3H50 является мерой функциональной активности, но с особым акцентом на C3, так как требует экзогенного добавления C3. Сыворотка была дефицитной в C3. Подготовленные экспериментальные условия (условия 1 и 2) добавляют к дефицитной сыворотке в разведении 1/50 для тестирования. Инкубацию в тесте с эритроцитами проводили при 22°C в течение 45 минут.

8. Результаты

Результаты показывают, что ингибирование активации комплемента, оцениваемое по гемолитической активности, опосредуется расщеплением C3.

Тестовое или контрольное изделие	Маркировка пробирки	Очищенный C3 (Да/Нет)	Тестовое состояние	Конечная концентрация в Тестовом состоянии (нМ, если не указано)	Гемолитическая активность (Ед/мл)
Только солевой раствор	S	Н	Тестовое состояние № 1	НД	82.43
Физиологический раствор	SC	Д	Тестовое состояние № 2	НД	375.81
Тестовое изделие № 1	1-A	Д	Тестовое состояние № 1	200	437.77
	1-B	Д		40	594.13
	1-C	Д		8	470.03
Тестовое изделие № 1	2-A	Д	Тестовое состояние № 2	200	73.67
	2-B	Д		40	97.89
	2-C	Д		8	295.35

* Условие испытания № 1: инкубировать компоненты отдельно в течение 2 часов при 37°C ($\pm$ 2°C). Затем замораживают при -80°C или ниже до испытания на C3H50 (гемолитическая активность C3) с обедненной сывороткой (т.е. без предварительного расщепления сыворотки C3).

* Условие испытания № 2: смешать компоненты вместе с легким встряхиванием и инкубировать в течение 2 часов при 37°C ($\pm$ 2°C) (т.е. предварительное расщепление сыворотки C3 полипептидом MTSP-1 (SEQ ID NO: 35).

Эти данные показывают, что преинкубация C3 с вариантом MTSP-1 с SEQ ID NO: 35 (которая расщепляет C3 в сайте QHAR/ASHL) существенно ингибирует активацию комплемента в сыворотке человека. Предварительная инкубация сыворотки человека в течение 1 часа с вариантом MTSP-1 снижает гемолитическую активность сыворотки приблизительно на 80%.

Пример 13

Сайт-специфический мутагенез примерного варианта MTSP-1 для установления отношений структура-активность для отдельных мутаций в MTSP-1

Для оценки эффекта каждой замены, вставки или делеции использовали сайт-специфический мутагенез для создания 14 вариантов варианта MTSP-1, который содержит модификации

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D (стартовый вариант). Каждый из 14 вариантов содержал одну мутацию (по сравнению с исходным вариантом), в которой каждый мутантный остаток в исходном варианте (кроме C122S) был «обращен» (по одному в каждом варианте) к соответствующей аминокислоте, присутствующей в MTSP-1 дикого типа. Эти варианты показаны в Таблице 23 ниже со ссылкой на протеазный домен WT MTSP-1, представленный в SEQ ID NO: 4. Затененные клетки показывают, что модифицированные полипептиды MTSP-1 мутируют в этом остатке по сравнению с эталонным полипептидом MTSP-1, представленным в SEQ ID NO: 4. Не заштрихованные клетки указывают, что модифицированные полипептиды MTSP-1 содержат ту же аминокислоту, что и эталонный полипептид MTSP-1, представленный в SEQ ID NO: 4.

Активность анти-C3 каждого выбранного варианта оценивали путем измерения ED₅₀ для расщепления C3, как описано выше, и стабильность каждого варианта оценивали путем измерения остаточной ферментативной активности с использованием флуорогенного субстрата AGR-ACC после инкубации в течение 7 дней, либо в буфере [Фосфатно-солевой буфер (PBS)], либо в 80% стекловидного тела обезьяны *Cynomolgus*, как показано ниже. Эти данные демонстрируют, что приблизительно 50% полипептидов "исходного варианта" проявляют большую активность в отношении C3 в стекловидном теле, чем эталонный протеазный домен MTSP-1 дикого типа, последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 4. Кроме того, 12/14 модифицированных полипептидов MTSP-1 более стабильны в стекловидном теле по сравнению с эталонным доменом протеазы дикого типа SEQ ID NO: 4, причем некоторые демонстрируют большую стабильность, чем другие. Терапевтические кандидаты для глазных показаний, таких как AMD, включая те, которые приведены в таблице ниже, представляют собой варианты, которые проявляют высокую активность C3-расщепления и высокую стабильность при стекловидном теле.

Активность C3 (то есть ED₅₀) модифицированных полипептидов MTSP-1 измеряли *in vitro*, как описано выше. Стабильность полипептидов MTSP-1 после инкубации в течение 7 дней в стекловидном теле обезьяны *Cynomolgus* или в физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS) измеряли с помощью анализа активности с использованием флуорогенного субстрата AGR-ACC.

Таблица 23. Активность 14-ти вариантов модифицированного полипептида MTSP-1 в отношении C3.

SEQ ID NO:	Мутации (по химотрипсиновой нумерации)													Стабильность (% активности) полипептида MTSP-1 на 7 день		
	Q38	I41	D60b	F60e	Y60g	D96	F97	Ins97a	T98	F99	G151	Q175	Q192	hC3 расщепление (ED ₅₀ , нМ)	Стекловидное тело	PBS
5	Q	I	D	F	Y	D	F		T	F	G	Q	Q	13.6	59	63
35	H	S	T	S	W	K	G	V	P	L	H	L	D	4.6	92	94
47	Q	S	T	S	W	K	G	V	P	L	H	L	D	17	86	87
48	H	I	T	S	W	K	G	V	P	L	H	L	D	205	76	78
49	H	S	D	S	W	K	G	V	P	L	H	L	D	13	87	81
50	H	S	T	F	W	K	G	V	P	L	H	L	D	8.7	85	91
51	H	S	T	S	Y	K	G	V	P	L	H	L	D	22	85	93
38	H	S	T	S	W	D	G	V	P	L	H	L	D	11.9	73	91
39	H	S	T	S	W	K	F	V	P	L	H	L	D	20	77	85
52	H	S	T	S	W	K	G		P	L	H	L	D	7.9	19	34
53	H	S	T	S	W	K	G	V	T	L	H	L	D	9.9	66	82
54	H	S	T	S	W	K	G	V	P	F	H	L	D	18	94	98
55	H	S	T	S	W	K	G	V	P	L	G	L	D	5.3	74	87
56	H	S	T	S	W	K	G	V	P	L	H	Q	D	20	90	94
40	H	S	T	S	W	K	G	V	P	L	H	L	Q	1.6	18	23

Данные в примерах и выше показывают, что модифицированные полипептиды MTSP-1 эффективно расщепляют человеческий C3 и поддерживают 59–94% этой активности после инкубации в течение 7 дней в стекловидном теле.

Например, модифицированные полипептиды MTSP-1 расщепляют человеческий C3 между остатками 740 и 741 (SEQ ID NO: 9), чтобы тем самым инактивировать C3:

Q H A R ↓ A S H L 737–744

P4 P3 P1 ↓ P1 'P4'.

Функциональные последствия модификации полипептидов MTSP-1, таких как модифицированные полипептиды MTSP-1, которые содержат мутации: Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/G151H/Q175L/Q192D

или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, где C122S включен для уменьшения агрегации (см., например, SEQ ID NO: 35, в которой представлен протеазный домен модифицированных полипептидов MTSP-1, который содержит эти мутации):

Q38H – эта мутация увеличивает активность C3 примерно в 3,7 раза.

I41S – эта мутация увеличивает активность анти-C3 примерно в 44,6 раза. D60bT – эта мутация увеличивает активность анти-C3 примерно в 2,8 раза.

F60eS – эта мутация увеличивает активность анти-C3 примерно в 1,9 раза.

Y60gW – эта мутация увеличивает субстратную специфичность фермента и увеличивает активность анти-C3 примерно в 4,8 раза.

D96K – эта мутация увеличивает активность анти-C3 примерно в 2,6 раза.

F97G – эта мутация увеличивает активность анти-C3 примерно в 4,3 раза и повышает специфичность субстрата.

Вставка 97aV: эта мутация увеличивает специфичность субстрата модифицированного полипептида MTSP-1, повышает стабильность модифицированных полипептидов MTSP-1 после 1-недельной инкубации при 37°C примерно в 4,8 раза и увеличивает активность анти-C3 примерно в 1,7 раза.

T98P: эта мутация повышает стабильность фермента после 1-недельной инкубации при 37°C в 1,4 раза и увеличивает активность анти-C3 примерно в 2,2 раза.

F99L: эта мутация увеличивает активность анти-C3 примерно в 3,9 раза. G151H: эта мутация увеличивает активность анти-C3 примерно в 1,2 раза.

Q175L: эта мутация увеличивает активность анти-C3 примерно в 4,3 раза.

Q192D: Эта мутация увеличивает стабильность при стекловидном теле после 1 недели инкубации при 37°C в 5,1 раза.

Среди полипептидов те, которые содержат мутации Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D и I41D/C122S/G151N/Q192T, предназначены для использования и для D-T192G для использования в качестве триггера для использования в качестве трипинга/или AMD.

Все остатки в полипептидах MTSP-1 обозначены по химотрипсиновой нумерации. Немодифицированные полипептиды MTSP-1 включают полипептиды с последовательностями SEQ ID NO: 1-4, полноразмерный MTSP-1 WT, протеазный домен WT MTSP-1, зрелый MTSP-1 WT, полноразмерный MTSP-1 с C122S, протеазный домен MTSP-1 с C122S, зрелый MTSP-1 с C122S, соответственно, где нумерация

аминокислотных остатков указана в соответствии с химотрипсиновой нумерацией. Все модифицированные полипептиды MTSP-1 могут включать замену C122S вместо C122C.

* * *

Поскольку модификации будут очевидны для специалистов в данной области техники, предполагается, что это изобретение ограничено только объемом прилагаемой формулы изобретения.

Список литературы

1. Rich R.L. (2000) Curr. Opi. in Biotechn., 11: 54–61;
2. Englebienne P.: (1998) Analyst 123(7): 1599–1603;
3. Fundamental Immunology, 2nd ed., Edited by Paul W.E., Raven Press, New York, pp. 332–336
Paul, ed., (1989)
4. Malmqvist M.: (2000) Biochem Socy Trans., 27: 335–340;
5. Scatchard et al. (1949), Ann N.Y. Acad. Sci., 51: 660;
6. J. Biol. Chem., 243: 3557–3559 (1968)
7. Ostresh J. M. (1994) Biopolymer 34: 681–1689.
8. Computational Molecular Biology, Lesk, AM, ed., Oxford University Press, New York, 1988;
9. Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993;
10. Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994;
11. Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987;
12. Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991;
13. Carillo H. (1988) SIAM J, 48: 1073-;
14. Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48: 443;
15. Smith–Waterman (Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)
16. Gribskov et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745 (= Грибскова и соавт. (1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745);
17. Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas of Sein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353–358 (1979);
18. Adv. Appl. Math. (1991) 12: 337–357);

19. Watson et al. *Molecular Biology of the Gene*, 4-d, 1987, Benjamin/Cummings Pub. Co., P. 224;
20. Field et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8: 2159–2165;
21. Evan et al. (1985), *Molecular and Cellular Biology* 5: 3610–3616;
22. Paborsky et al. (1990) *Protein Engineering* 3: 547–553;
23. см. (1972) *Biochem.* 11: 1726;
24. Takeuchi (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 11054–1161;
25. Takeuchi (2000), *J. Biol. Chem.*, 275(34): 26333–42;
26. Lee et al. (2000) *J Biol Chem* 275: 36720–36725;
27. Barret A.J., In: *Proteinase Inhibitors*, Ed.
28. Barrett A. J. et al., Elsevier, Amsterdam, Pages 3–22 (1986);
29. Strassburger W. et al. (1983) *FEBS Lett* 157: 219–223;
30. Dayhoff M.O., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Vol 5, National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Md. (1972);
31. Rosenberg R.D. et al. (1986) *Hasp Prac* 21: 131–137;
32. Hartley B.S. (1974) *Symp Soc Gen Microbiol* 24: 152–182;
33. Richardson J. (1981) *Adv Prot Chem* 34: 167–339;
34. Stroud R.M. (1974) *SciAm* 231: 24–88;
35. Friedrich et al. (2002) *J Biol Chem* 277(3): 2160;
36. Ge et al. (2006) *J Biol Chem* 281: 7406–7412;
37. Basel–Vanagaite et al. (2007) *Am J Hum Genet* 80: 467–477;
38. Kim et al. (1999) *Immunogenetics* 49: 420–428;
39. Oberst и др. (2001), *Am. J. Pathol.*, 158: 1301–1311;
40. List et al. (2002) , *Oncogene*, 23 (23): 2765–3779;
41. List et al. (2009), *Am. J. Pathology*, 175: 1453–1463;
42. Kendall et al. (2008), *Stem Cells*, 26 (6): 1575–86;
43. Markiewski and Lambris (2007) *Am J Pathology* 171: 715–727;
44. Ricklin and Lambris (2007) *Nat Biotechnol* 25: 1265–1275;
45. Malhotra et al., (1994) *Clin Exp Immunol.* 97 (2): 4–9;
46. Holmskov et al. (1994) *Immunol Сегодня* 15 (2): 67–74;
47. Gaboriaud и др. (2003) *J. Biol. Chem.* 278 (47): 46974–46982;
48. Liu et al. (2005) *J. Immunol.* 175: 3150–3156;
49. Bhole et al. (2003) *Crit Care Med* 31(1): 97 –104;
50. Sahu and Lambris (2001) *Immunological Reviews* 180: 35–48;
51. Rawlings ND et al. (1994) *Meth Enzymol* 244: 19–26;

52. Wells (1990) *Biochem* 29: 8509–8517;
53. Miyake et al. (2010) *Biochim BioPhys Acta* 1804(1): 156–165;
54. List et al. (2007) *J. Biol. Chem.* 282(50): 36714–36723;
55. Desilets et al. (2008) *J. Biol. Chem.* 283(16): 10535–10542;
56. Szabo (2009) *Am J Pathol.* 174(6): 2015;
57. Alef et al. (2009) *J Invest Dermatol.* 129(4): 862;
58. Oberst et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278(18): 26773;
59. Liang et al. (2009) *BMC Bioinformatics* 10: 302;
60. Yang et al. (2009) *Rev. Med. Virol.* 19: 77–96;
61. Roberts et al. (2002) *Advanced Drug Delivery Review* 54: 459–476;
62. Harris and Zalipsky (eds.) "Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications"
ACS Symposium Series 680, 1997;
63. Mehvar et al. (2000) *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 3(1):– 136;
64. Harris and Chess (2003) *Nat Rev Drug Discov.* 2(3): 214–221;
65. Tsubery (2004), *J Biol. Chem* 279(37): 38118–38124;
66. Harris (2002) *Adv. DrugDeliv. Rev.* 54: 459–476;
67. Veronese et al. (2002) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 177–180;
68. Chapman et al. (1999) *Nature Biotech.* 17: 780–783;
69. Sato (2002) *Adv. DrugDeliv. Rev.* 54: 487–504;
70. Lu и Felix. (1994) *Int. J. Peptide Protein Res.* 43: 127–138;
71. Lu and Felix (1993) *Peptide Res.* 6: 142–146;
72. Felix et al. (1995) *Int. J. Peptide Res.* 46: 253–264;
73. Benhar et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 13398–13404;
74. Brumeanu et al. (1995) *J. Immunol.* 154: 3088–3095;
75. Caliceti et al. (2003) *Adv. DrugDeliv. Rev.* 55(10): 1261–1277;
76. Molineux (2003) *Pharmacotherapy* 23(8 Pt 2): 3S–8S;
77. Monfardini et al. (1995) *Bioconjugate Chem.* 6: 62–69;
78. Veronese et al. (1997) *J. Bioactive Compatible Polymers* 12: 197–207;
79. Kabouridis (2003) *TRENDS Biotech* 21(11): 498–503;
80. Ruben et al. (1989) *J Virol.* 63: 1–8;
81. Elliott and O'Hare (1997) *Cell* 88: 223–233;
82. Derossi et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 18188–18193;
83. Kokryakov et al. (1993) *FEBS Lett.* 327: 231–236;
84. Lin et al. (1995) *J Biol. Chem.* 270: 14255–14258;
85. Futaki et al. (2003) *J. Mol. Recognit.* 16: 260–264;

86. Suzuki et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 5836–5840;
87. Pooga et al. (1988), *FASEB J.* 12: 67–77;
88. Pooga et al. (2001) *FASEB J.* 15: 1451–1453;
89. Oehlke et al. (1998) *Biochim. Biophys. Acta.* 1414: 127–139;
90. Wyman et al. (1997) *Biochemistry* 36: 3008–3017;
91. Akkarawongsa et al. (2008) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 52 (6): 2120–2129;
92. Tjernberg et al. (2008) *Transplantation* 85: 1193–1199;
93. Fiane et al. (1999) *Ксенотрансплантация* 6: 52–65;
94. Lappegard et al. (2008) *J Biomed Mater Res A* 87: 129–135;
95. Lappegard et al. (2005) *Ann Thorac Surg* 79: 917–923;
96. Nilsson et al. (1998) *Blood* 92: 1661–1667;
97. Schmidt et al. (2003) *J Biomed Mater Res A* 66: 491–499;
98. Mollnes et al. (2002) *Blood* 100: 1867–1877;
99. Soulika et al. (2000) *Clin Immunol* 96: 212–221;
100. Chi et al. (2010) *Adv Exp Med Biol* 703: 127–135;
101. Pennesi et al. (2012) *Mol. Aspect Med.* 33 (4): 487–509;
102. Fletcher и др. (2014) *Optm. Vis. Sci.* 91 (8): 878–886;
103. Forest и др. (2015) *Модели и механизмы заболеваний* 8: 421–427;
104. Hanto et al., (2010) *Am J Transplant* 10(11): 2421–2430)
105. Petrinec et al. (1996) *Surgery* 61: 1331–1337;
106. Stewart et al. (1969) *Solid-Phase Peptide Synthesis*, WH Freeman Co., Сан-Франциско;
107. Merrifield J (1963) *J Am Chem Soc*, 85: 2149–2154;
108. Benoist and Chambon (1981) *Nature* 290: 304–310;
109. Yamamoto et al. (1980) *Cell* 22: 787–797;
110. Wagner et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1441–1445;
111. Brinster et al. (1982) *Nature* 296: 39–42;
112. Jay et al., (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 5543;
113. DeBoer et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50: 21–25;
114. "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": in *Scientific American* 242:19-94 (1980);
115. Herrera-Estrella et al. (1984) *Nature* 303: 209–213;
116. Garder et al. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9: 2871;
117. Herrera-Estrella et al. (1984) *Nature* 310: 115–120;
118. Swift et al. (1984) *Cell* 35: 639–646;
119. Ornitz et al. (1986) *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 50: 399–409;
120. MacDonald (1987) *Hepatology* 7: 425-515;

121. Hanahan et al. (1985) *Nature* 315: 115–122;
122. Grosschedl et al. (1984) *Cell* 35: 647–658;
123. Adams et al. (1985) *Nature* 375: 533–538;
124. Alexander et al. (1987) *Mol. Cell Biol.* 7: 1436–1444;
125. Leder et al. (1986) *Cell* 45: 485–495;
126. Pinckert et al. (1987) *Genes and Devel.* 7: 268–276;
127. Krumlauf et al. (1985) *Mol. Cell Biol.* 5: 1639–1648;
128. Hammer et al. (1987) *Science* 235: 53–58;
129. Kelsey et al. (1987) *Genes and Devel.* 7: 161–171;
130. Magram et al., (1985) *Nature* 375: 338–340;
131. Kollias и др. (1986) *Cell* 46: 89–94;
132. Readhead et al. (1987) *Cell* 48: 703–712;
133. Shani (1985), *Nature* 374: 283–286;
134. Mason et al. (1986) *Science* 234: 1372–1378;
135. Scharf et al. (1994) *Results Probl Cell Differ* 20: 62;
136. Bittner et al. (1987) *Methods in Enzymol* 153: 516–544;
137. Miller et al. (1993) *Meth. Enzymol.* 217: 581–599;
138. Wigler et al., (1977) *Cell* 11: 223–232;
139. Lowy I et al. (1980) *Cell* 22: 817–23;
140. Wigler M et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci*, 77: 3567–70;
141. Colbere–Garapin F et al. (1981) *J. Mol. Biol*, 150: 1–14;
142. Hartman SC и RC Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci*, 85: 8047–8051;
143. Rhodes CA et al. (1995) *Methods Mol. Biol* 55: 121–131;
144. Pham et al. (2003) *Biotechnol. Bioeng.* 84: 332–42.;
145. Zhao and Harris, *ACS Symposium Series* 680: 458–72, 1997;
146. Zalipsky (1995) *Adv. Drug Del. Rev.* 16: 157–82
147. Sawhney et al. (1993) *Macromolecules* 26: 581–87
148. Krupers et al. (1996) *Eur Polym J.* 32: 785–790
149. Strohl (2015) *BioDrugs* 29: 215–239;
150. Ausubel et al. (eds.) *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, John Wiley & Sons, 1992;
151. Weiner et al. (1985) *J Pharm Sci.* 74 (9): 922–5;
152. Lindenbaum et al. (2004) *Nucleic Acids Res.* 32 (21): e172
153. Ketner et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6186–6190
154. Wang et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8955–8959;

155. Moxley et. и др. (1987) *Arthritis & Rheumatism* 30: 1097–1104;
156. Wang et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8563–8568;
157. Buyon et al. (1992) *Arthritis Rheum* 35: 1028–1037;
158. Couser et al. (1995) *J Am Soc Nephrol.* 5: 1888–1894;
159. Stove et al. (1996) *Clin Diag Lab Immunol* 3: 175–183;
160. Hack et al. (1989) *Am. J. Med.* 86: 20– 26;
161. Zilow et al. (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 79: 151–157;
162. Stevens et al. (1986) *J. Clin. Invest.* 77: 1812–1816
163. Hecke et al. (1997) *Shock* 7:74; и
164. Heideman et al. (1984) *J. Trauma* 24: 1038–1043;
165. Austen WG et al. (2003) *Int J Immunopathol Pharm* 16 (1): 1–8;
167. Bradley et al. (2011) *Eye* 25: 683–693;
168. Gemenetzi et al. (2016) *Eye* 30: 1–14;
169. Danobeitia et al. (2013) [аннотация]. *Am J Transplant.* 13 (Suppl 5);
170. Yu et al. (2016) *Am J Transplant* 16 (9): 2589–2597;
171. Castallano et al. (2010) *Am J Pathol* 176 (4): 1648–1659;
172. Guo et al. (2003) *FASEB J* 13: 1889;
173. McGeer et al., (2002) *Trends Mol Med* 8: 519
174. Guo et al. (2005) *Ann Rev Immunol.* 23: 821;
175. Ghosh et al. (2015) *Endocr Rev* 36: 272–288;
176. Purushottam et al. (2007) *Mol Immunol.* 44: 3901–3908;
177. Jager et al. (2008) *N Engl J Med* 358: 2606–2617;
178. Gass, JD (1972) *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 70: 409–36;
179. Hageman et al., (2001) *Prog. Retin. Eye. Res.* 29: 95–112;
180. Hageman et al. (2005) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 102: 7227–7232;
181. Mullins et al. (2000) *FASEB J* 14: 835–846;
182. Anderson et al., (2010) *Pro. Retin. Eye Res.* 29: 95–112;
183. Crabb et al. (2002) *Proc Natl Acad Sci* 99: 14682–14687;
184. Johnson et al. (2002) 99: 11830–11835;
185. Johnson et al., (2000) *Exp Eye Res* 70, 441–9;
186. Anderson et al., (2002) *Am J Ophthalmol* 134, 411–31;
187. Leitner et al., (2001) *Exp Eye Res* 73, 887–896;
188. Johnson et al. (2001) *Res* 73, 887–896;
189. Scholl et al., (2008) *PLoS One* 3: e2593;
190. Klein et al. (2005) *Science* 308 (5720): 385–389;

191. Yates et al., (2007) NEJM357: 553–561;
192. Ricklin et al. (2008) Adv. Exp. Med. Biol. 632: 273–292;
193. Elham et al. (2010) Curr Opin Organ Transplant. 15: 486–491;
194. Horizon Scanning Research and Intelligence Center, сентябрь 2016 года;
195. Johnson et al. (2015), Curr. Opin. Organ. Transplant., 20(6): 643–651;
196. Kikic et al. (2014) Transpl Int 27 (3): 312–321;
197. Pratt et al. (2002) Nat Med 8 (6): 582–587;
198. Damman et al. (2011) Nephrol Dial Transplant 26 (7): 2345–2354;
199. Piddlesden et al. (1994), J. Immunol., 152: 5477;
200. Szalai et al. (2000), J. Immunol., 164: 463;
201. Mizuno et al., (2002) Int Arch Allergy Immunol 127: 55–62;
202. Buerke et al. (2001), J. Immunol., 167: 5375;
203. Rinder et al. (1995), J. Clin. Invest., 96: 1564;
204. Edwards et al. (2005), Science, 308 (5720): 421–424;
205. Hageman et al. (2005), Proc. Nat. Acad. Sci, 102 (20): 7227–7232;
206. Haines et al. (2005), Science, 308 (5720): 419–421;
207. Thakkestian et al. (2006), Hum. Mol. Genet., 15 (18): 2784–2790;
208. Zarepari et al. (2005), Am. J. Hum. Genet., 77 (1): 149–153;
209. Coffey et al. (2007), Proc. Nat. Acad. Sci., 104: 16651–16656;
210. Montes et al. (2009), Proc. Nat. Acad. Sci., 106 (11): 4366–4371;
211. Gold et al. (2006), Nat. Genet., 38 (4): 458–462;
212. Mailer et al. (2007), Nat. Genet., 39 (10): 1200–1201;
213. Reynolds et al. (2009), Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 50 (12): 5818–5827;
214. Malyszko et al. (2015) Nature Scientific Reports 5: 11684;
215. Wanga et al. (2015) PLoS One 10(9): e0136276;
216. Morgan et al., (2003) Mol Immunol. 40: 159;
217. Deng et al. (201 X) MAbs 3 (1): 61–66.

ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированный полипептид сериновой протеазы 1 мембранного типа (MTSP-1), содержащий одну или более из следующих модификаций аминокислот (ы): I41S, Q38H, D60bT, F60eS или R, Y60gW, ins97aV, D96K, F97G, G151H или N и Q192T, причем модифицированный полипептид MTSP-1 обладает повышенной активностью/специфичностью в отношении белка комплемента по сравнению с немодифицированной активной формой полипептида MTSP-1, где:

модификации аминокислот выбраны из замен, вставок и/или делеций в немодифицированном полипептиде MTSP-1;

модифицированный полипептид MTSP-1 расщепляет белок комплемента, тем самым ингибируя или уменьшая активацию комплемента по сравнению с активной формой немодифицированного полипептида MTSP-1, который не содержит модификацию (и) аминокислот (ы);

аминокислотные остатки нумеруются химотрипсиновой нумерацией; где соответствующие аминокислотные остатки определяются и нумеруются выравниванием по химотрипсину; и где

немодифицированный полипептид MTSP-1 содержит последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO: 1-4, или ее каталитически активный фрагмент или форму, которая включает модификацию (и) аминокислот (ы).

2. Модифицированный полипептид сериновой протеазы 1 мембранного типа (MTSP-1), содержащий модификации аминокислот, которые увеличивают активность/специфичность расщепления белка C3 комплемента человека по сравнению с немодифицированной активной формой полипептида MTSP-1, где:

расщепление происходит между остатками 740 и 741 SEQ ID NO: 9, в результате чего расщепление происходит при Q H A R ↓ A S H L с EC₅₀ 10 нМ или менее *in vitro*;

модифицированный полипептид MTSP-1 расщепляет белок C3 комплемента, тем самым ингибируя или уменьшая активацию комплемента по сравнению с активной формой немодифицированного полипептида MTSP-1, который не содержит модификацию (и) аминокислот (ы);

модифицированный MTSP-1 содержит по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5, или по меньшей мере 6, или по меньшей мере 7 модификаций аминокислот;

модификации аминокислот выбраны из замен, вставок и/или делеций в немодифицированном полипептиде MTSP-1; и

немодифицированный полипептид MTSP-1 содержит последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO: 1–4, или ее каталитически активный фрагмент или форму, которая включает модификацию (и) аминокислот.

3. Модифицированный полипептид MTSP-1 по п. 1, где белок комплемента представляет собой C3.

4. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–3, который расщепляет целевой сайт в C3, расщепление которого инактивирует C3.

5. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1, 3 и 4, где целевой сайт содержит остатки 737–744 белка C3 комплемента.

6. Модифицированный полипептид MTSP-1 по п. 4, где расщепление происходит между остатками 740 и 741 SEQ ID NO: 9, посредством чего расщепление происходит в Q H A R ↓ A S H L.

7. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–6, в котором часть, соответствующая протеазному домену полипептида MTSP-1, обладает повышенной активностью в отношении расщепления C3, которая по меньшей мере в 1 раз больше или более чем в 1 раз больше активности полипептида MTSP-1 с SEQ ID NO: 4; и где последовательность аминокислот протеазного домена полипептида MTSP-1, которая соответствует указанной части, приведена в SEQ ID NO: 2.

8. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–7, в котором активность оценивают *in vitro* путем протеолиз-опосредованного ингибирования или инактивации белка C3 комплемента, или путем анализа активности комплемента в сыворотке крови в гемолитическом анализе или путем определения значений ED₅₀ протеазного домена модифицированного полипептида MTSP-1 по сравнению с протеазным доменом немодифицированного полипептида MTSP-1 с SEQ ID NO: 4.

9. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–8, который обладает повышенной активностью в отношении расщепления C3, которая по меньшей мере в 1,2 раза или по меньшей мере в 1,5 раза превышает активность немодифицированного полипептида MTSP-1 с SEQ ID NO: 4.

10. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–8, который обладает повышенной активностью в отношении расщепления C3, которая по меньшей мере в 3 раза или по меньшей мере в 4 раза превышает активность немодифицированного полипептида MTSP-1 с SEQ ID NO: 4.

11. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–10, где немодифицированный полипептид MTSP-1 состоит из последовательности аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 1–4.

12. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–10, где немодифицированный полипептид MTSP-1 состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 4.

13. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–10, где модифицированный полипептид MTSP-1 имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с полипептидами, представленными в любой из SEQ ID NO: 1–4.

14. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–13, где модифицированный полипептид MTSP-1 имеет 1 или до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен, вставок или делеций по сравнению с немодифицированным полипептидом MTSP-1, представленным в любой из SEQ ID NO: 1–6, или его каталитически активной частью.

15. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–14, содержащий модификацию, соответствующую I41S.

16. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–15, содержащий модификацию, соответствующую Q38H.

17. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–16, содержащий модификацию, соответствующую D60bT.

18. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–17, содержащий модификацию, соответствующую F60eS.

19. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–18, содержащий модификацию, соответствующую Y60gW.

20. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–19, содержащий модификацию, соответствующую ins97aV.

21. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–20, содержащий модификацию, соответствующую D96K.

22. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–21, содержащий модификацию, соответствующую F97G.

23. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–22, содержащий модификацию, соответствующую G151H.

24. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–22, содержащий модификацию, соответствующую G151N.

25. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–24, содержащий модификацию, соответствующую Q192T.

26. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–24, содержащий модификацию, соответствующую Q192D.

27. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–24, содержащий модификацию, соответствующую Q192E.

28. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–17 и 19–27, содержащий модификацию, соответствующую F60eR.

29. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–8, дополнительно содержащий модификацию, соответствующую Y59F.

30. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–29, дополнительно содержащий модификацию, соответствующую F99L.

31. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–30, дополнительно содержащий модификацию, соответствующую T98P.

32. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–31, дополнительно содержащий модификацию, соответствующую Q175L.

33. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–32, дополнительно содержащий модификацию в положении, соответствующем D217.

34. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–32, дополнительно содержащий модификацию, соответствующую D217V, I, L, W или M.

35. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–14 и 16–34, дополнительно содержащий модификацию, соответствующую I41D, E, T, G или R.

36. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–14, содержащий модификации, соответствующие I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T или I41D/C122S/G151N/Q192T или I41S/F99L/C122S/G151N/Q192V или I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T; или те же самые модификации, за исключением того, что C122S представляет собой C122C.

37. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–14, содержащий модификации, соответствующие модификациям I41R/F97T/Ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E, или модификациям I41R/F97T/Ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D.

38. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–14, содержащий модификации, соответствующие: I41D/Y59F/D96E/F99L/C122S/G151N/Q192T, или соответствующие I41D/Y59F/C122S/G151N/Q192T.

39. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп.1–14, содержащий модификации, соответствующие любой из:

I41R/F97T/Ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E, или

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,
или

Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,
или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E,
или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
или

Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,
или

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
или

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96FF97Y/ins97aN/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/
Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/
Q192D, или

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/F97W/ins97aN/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/
Q192E, или

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96FF97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/F97E/ins97aV/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/
Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96L/F97D/ins97aG/T98N/F99L/C122S/G151H/Q175L/
Q192E, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/
Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96V/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/
Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/
Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
или
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
или
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L,
или
I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T, или I41D/C122S/G151N/Q192T, или
I41S/F99L/C122S/G151N/Q192V, или I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T, или
I41D/Y59F/D96E/F99L/C122S/G151N/Q192T, или I41D/Y59F/C122S/G151N/Q192T, или
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
или
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
или
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
или
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
или
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, или
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, или
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
или
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
или
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
или
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q192D,
или
Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D, или
I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, или
I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D, или
Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, или
Q38H/I41S/D60bY/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D/D217V, или
I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V, или
I41S/D60bY/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D/D217V, или

I41S/D96M/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V, или
 I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192V/D217I, или
 I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192H, или
 I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192N/D217V, или
 I41S/D60bY/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, или
 Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V, или
 I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192V, или
 I41S/P49S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V, или
 I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192N/I217V, или
 I41T/F97W/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192G/D217L, или
 I41G/F97L/F99L/C122S/Q175A/Q192T/D217V, или
 I41G/F97V/F99L/C122S/G151Q/Q175M/Q192A/D217L, или
 I41G/F97I/F99L/C122S/G151L/Q175M/Q192S/D217V, или
 I41G/F97S/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G/D217I, или
 I41T/F97L/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192S/D217W, или
 I41D/F97T/F99M/C122S/Q192V/D217M, и

те же самые модификации за исключением того, что C122S не была модифицирована и представляет собой C122C.

40. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп.1-38, включающий модификации, выбранные из комбинаций, включающих одну или несколько модификаций Q38H, I41S, D60bT, F60eS, Y60gW, D96K, F97G, Ins97aV и G151H, а именно из:

G151H, Ins97aV, Ins97aV/G151H, F97G, F97G/G151H, F97G/Ins97aV,
 F97G/Ins97aV/G151H, D96K, D96K/G151H, D96K/Ins97aV, D96K/Ins97aV/G151H,
 D96K/F97G, D96K/F97G/G151H, D96K/F97G/Ins97aV, D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Y60gW,
 Y60gW/G151H, Y60gW/Ins97aV, Y60gW/Ins97aV/G151H, Y60gW/F97G,
 Y60gW/F97G/G151H, Y60gW/F97G/Ins97aV, Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Y60gW/D96K,
 Y60gW/D96K/G151H, Y60gW/D96K/Ins97aV, Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H,
 Y60gW/D96K/F97G, Y60gW/D96K/F97G/G151H, Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, F60eS, F60eS/G151H, F60eS/Ins97aV,
 F60eS/Ins97aV/G151H, F60eS/F97G, F60eS/F97G/G151H, F60eS/F97G/Ins97aV,
 F60eS/F97G/Ins97aV/G151H, F60eS/D96K, F60eS/D96K/G151H, F60eS/D96K/Ins97aV,
 F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, F60eS/D96K/F97G, F60eS/D96K/F97G/G151H,
 F60eS/D96K/F97G/Ins97aV, F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, F60eS/Y60gW,
 F60eS/Y60gW/G151H, F60eS/Y60gW/Ins97aV, F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H,
 F60eS/Y60gW/F97G, F60eS/Y60gW/F97G/G151H, F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,

F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, F60eS/Y60gW/D96K,
 F60eS/Y60gW/D96K/G151H, F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, F60eS/Y60gW/D96K/F97G,
 F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H,

F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV, F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 D60bT, D60bT/G151H, D60bT/Ins97aV, D60bT/Ins97aV/G151H, D60bT/F97G,

D60bT/F97G/G151H, D60bT/F97G/Ins97aV, D60bT/F97G/Ins97aV/G151H,
 D60bT/D96K, D60bT/D96K/G151H, D60bT/D96K/Ins97aV, D60bT/D96K/Ins97aV/G151H,
 D60bT/D96K/F97G, D60bT/D96K/F97G/G151H, D60bT/D96K/F97G/Ins97aV,
 D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, D60bT7Y60gW, D60bT7Y60gW/G151H,
 D60bT/Y60gW/Ins97aV, D60bT/Y60gW/Ins97aV/G151H, D60bT/Y60gW/F97G,

D60bT/Y60gW/F97G/G151H, D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, D60bT/Y60gW/D96K, D60bT/Y60gW/D96K/G151H,
 D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV, D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H,
 D60bT/Y60gW/D96K/F97G, D60bT/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 D60bT7Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,

D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, D60bT/F60eS, D60bT/F60eS/G151H,
 D60bT/F60eS/Ins97aV, D60bT/F60eS/Ins97aV/G151H, D60bT/F60eS/F97G,
 D60bT/F60eS/F97G/G151H, D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV,

D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H, D60bT/F60eS/D96K,
 D60bT/F60eS/D96K/G151H, D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV,
 D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, D60bT/F60eS/D96K/F97G,
 D60bT/F60eS/D96K/F97G/G151H, D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV,
 D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW,
 D60bT/F60eS/Y60gW/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/F97G,
 D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/G151H, D60bT7F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/D96K,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S, I41S/G151H, I41S/Ins97aV,
 I41S/Ins97aV/G151H, I41S/F97G, I41S/F97G/G151H, I41S/F97G/Ins97aV,
 I41S/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D96K, I41S/D96K/G151H, I41S/D96K/Ins97aV,
 I41S/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/D96K/F97G, I41S/D96K/F97G/G151H,

I41S/D96K/F97G/Ins97aV, I41S/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/Y60gW,
 I41S/Y60gW/G151H, I41S/Y60gW/Ins97aV, I41S/Y60gW/Ins97aV/G151H,
 I41S/Y60gW/F97G, I41S/Y60gW/F97G/G151H, I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/Y60gW/D96K, I41S/Y60gW/D96K/G151H,
 I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV, I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/Y60gW/D96K/F97G,
 I41S/Y60gW/D96K/F97G/G151H, I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/F60eS, I41S/F60eS/G151H,
 I41S/F60eS/Ins97aV, I41S/F60eS/Ins97aV/G151H, I41S/F60eS/F97G,
 I41S/F60eS/F97G/G151H, I41S/F60eS/F97G/Ins97aV, I41S/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H,
 I41S/F60eS/D96K, I41S/F60eS/D96K/G151H, I41S/F60eS/D96K/Ins97aV,
 I41S/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/F60eS/D96K/F97G, I41S/F60eS/D96K/F97G/G151H,
 I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV,

I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/F60eS/Y60gW,
 I41S/F60eS/Y60gW/G151H, I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, I41S/F60eS/Y60gW/F97G,
 I41S/F60eS/Y60gW/F97G/G151H, I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/F60eS/Y60gW/D96K,
 I41S/F60eS/Y60gW/D96K/G151H,

I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV, I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H,
 I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G, I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,

I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT, I41S/D60bT/G151H,
 I41S/D60bT/Ins97aV, I41S/D60bT/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F97G,
 I41S/D60bT/F97G/G151H, I41S/D60bT/F97G/Ins97aV, I41S/D60bT/F97G/Ins97aV/G151H,
 I41S/D60bT/D96K, I41S/D60bT/D96K/G151H, I41S/D60bT/D96K/Ins97aV,
 I41S/D60bT/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/D96K/F97G,
 I41S/D60bT/D96K/F97G/G151H, I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV,
 I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/Y60gW,
 I41S/D60bT/Y60gW/G151H, I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV,
 I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/Y60gW/F97G,
 I41S/D60bT/Y60gW/F97G/G151H, I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/Y60gW/D96K,
 I41S/D60bT/Y60gW/D96K/G151H, I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV,

I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G,
 I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/G151H, I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,

I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS,
 I41S/D60bT/F60eS/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV, I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV/G151H,
 I41S/D60bT/F60eS/F97G,

I41S/D60bT/F60eS/F97G/G151H, I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS/D96K,
 I41S/D60bT/F60eS/D96K/G151H, I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G,
 I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/G151H, I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K,

I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H,

I41S/D60bT/F60eS"60gW/D96K/F97G,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H, Q38H/G151H,
 Q38H/Ins97aV, Q38H/Ins97aV/G151H, Q38H/F97G, Q38H/F97G/G151H,
 Q38H/F97G/Ins97aV, Q38H/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D96K, Q38H/D96K/G151H,
 Q38H/D96K/Ins97aV, Q38H/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/D96K/F97G,
 Q38H/D96K/F97G/G151H, Q38H/D96K/F97G/Ins97aV, Q38H/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/Y60gW, Q38H/Y60gW/G151H,

Q38H/Y60gW/Ins97aV, Q38H/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/Y60gW/F97G,
 Q38H/Y60gW/F97G/G151H, Q38H/Y60gW/F97G/Ins97aV,

Q38H/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/Y60gW/D96K,
 Q38H/Y60gW/D96K/G151H, Q38H/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/Y60gW/D96K/F97G,
 Q38H/Y60gW/D96K/F97G/G151H,

Q38H/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV, Q38H/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/F60eS, Q38H/F60eS/G151H, Q38H/F60eS/Ins97aV, Q38H/F60eS/Ins97aV/G151H,
 Q38H/F60eS/F97G, Q38H/F60eS/F97G/G151H, Q38H/F60eS/F97G/Ins97aV,
 Q38H/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS/D96K, Q38H/F60eS/D96K/G151H,
 Q38H/F60eS/D96K/Ins97aV, Q38H/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS/D96K/F97G,

Q38H/F60eS/D96K/F97G/G151H, Q38H/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW,
 Q38H/F60eS/Y60gW/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/F97G,
 Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/D96K,
 Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G,
 Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT, Q38H/D60bT/G151H,
 Q38H/D60bT/Ins97aV, Q38H/D60bT/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F97G,
 Q38H/D60bT/F97G/G151H, Q38H/D60bT/F97G/Ins97aV,

Q38H/D60bT/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/D96K,
 Q38H/D60bT/D96K/G151H, Q38H/D60bT/D96K/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/D96K/F97G,
 Q38H/D60bT/D96K/F97G/G151H,

Q38H/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV, Q38H/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/D60bT/Y60gW, Q38H/D60bT/Y60gW/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/F97G,
 Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/D96K,
 Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G,
 Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS,
 Q38H/D60bT/F60eS/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/Ins97aV,

Q38H/D60bT/F60eS/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/F97G,
 Q38H/D60bT/F60eS/F97G/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/D96K,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G,

Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G,

Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,

Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S,
 Q38H/I41S/G151H, Q38H/I41S/Ins97aV, Q38H/I41S/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F97G,
 Q38H/I41S/F97G/G151H, Q38H/I41S/F97G/Ins97aV, Q38H/I41S/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/D96K, Q38H/I41S/D96K/G151H, Q38H/I41S/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D96K/F97G, Q38H/I41S/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/I41S/D96K/F97G/Ins97aV, Q38H/I41S/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/Y60gW, Q38H/I41S/Y60gW/G151H, Q38H/I41S/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/I41S/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/Y60gW/F97G,
 Q38H/I41S/Y60gW/F97G/G151H,

Q38H/I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV, Q38H/I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/Y60gW/D96K, Q38H/I41S/Y60gW/D96K/G151H,
 Q38H/I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV, Q38H/I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV/G 151 H,
 Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G, Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,

Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS,
 Q38H/I41S/F60eS/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Ins97aV, Q38H/I41S/F60eS/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/F60eS/F97G, Q38H/I41S/F60eS/F97G/G151H, Q38H/I41S/F60eS/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS/D96K,
 Q38H/I41S/F60eS/D96K/G151H, Q38H/I41S/F60eS/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G,
 Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/G151H, Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G,

Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT,
 Q38H/I41S/D60bT/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Ins97aV, Q38H/I41S/D60bT/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F97G, Q38H/I41S/D60bT/F97G/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/D96K,
 Q38H/I41S/D60bT/D96K/G151H, Q38H/I41S/D60bT/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G,
 Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/G151H, Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F60eS,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT7F60eS/Y60gW/D96K, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, и модификации,
 соответствующие перечисленным и не содержащими модификацию C122S.

41. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1-38, включающий модификации, выбранные из комбинаций, которые включают T98P/F99L/Q175L/Q192D, необязательно C122S, и одну или более модификаций, выбранных из: Q38H, I41S, D60bT, F60eS, Y60gW, D96K, F97G, Ins97aV и G151H, а именно:

T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, D60bT/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, I41S/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

I41S/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

I41S/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

I41S/D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99IJC122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192 D,

Q38H/I41S/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D

,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

и те же самые модификации за исключением того, что C122S не была модифицирована и представляет собой C122C.

42. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–38, включающий модификации, выбранные из комбинаций модификаций MTSP-1, в которых протеазный домен расщепляет человеческий C3 *in vitro* с EC₅₀ менее 10 нМ:

ins97aA/F97G/T98L/C122S/Q175M/Q192A/D217I/K224R,

Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L,
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E,

Q38G/H40R/I41H/D60bN/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G,
Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L,
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E,

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96F/F97D/ins97aE/T98S/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192A,

Q38F/I41A/D60bT/F60eG/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L,
Q38H/I41A/D60bV/F60eT/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L,
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E,

Q38Y/I41A/D60bL/F60eQ/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192A,
Q38H/I41S/D60bF/F60eV/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192A,
Q38H/I41A/D60bV/F60eA/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192V,
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96M/ins97aN/F97Y/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96L/ins97aG/F97D/T98N/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E,

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38F/I41S/D60bF/F60eR/Y60gF/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/
Q192V,

Q38H/I41S/D60bY/D96Y/ins97aV/F97D/T98P/F99L/L106M/C122S/I136M/Q192G/Q209L/
D217T,

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96S/ins97aR/F97A/T98S/F99L/C122S/G151N/
Q175L/ Q192T,

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96Mns97aN/F97Y/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/
Q192D,

Q38H/I41A/D60bT/F60eH/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
ins97aY/F97G/T98V/C122S/Q175M/Q192S/D217V,

Q38H/I41S/D60bS/ins97aV/F97D/T98P/F99L/M117L/C122S/I136T/Q192G/D217I,

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96FF97N/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/
Q192D,

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151N/
Q175L/Q192D,

Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192A,
H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192G/D217V/K224Y,
I41G/F97I/F99L/C122S/G151L/Q175M/Q192S/D217V,

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96V/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/
Q192D,

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96FF97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/
Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/T150S/G151H/
Q175L/Q192D/Q209L,

Q38H/I41A/D60bV/F60eI/Y60gW/F97T7ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192
D, Q38H/I41A/D60bW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136M/Q192G/D217N,

Q38H/I41S/D60bF/F60eT/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/H143Q/G151N/Q175L/
Q192G, Q38Y/I41S/D60bT/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,

Q38H/I41A/F60eH/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192A,
I41T/D60bW/F60eH/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G,

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96F/F97Y/ins97aD/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/
Q192D,

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97S/ins97aH/T98G/F99L/C122S/G151N/
Q175L/Q192G,

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E,
I41S/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192G/D217V,

Q38M41S/D60bY/F60eD/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192A,
Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,
H40R/I41H/Y60gH/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192G/D217I/K224L,

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97D/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97Y/ins97aN/T98G/F99M/C122S/G151N/Q175L/
Q192G,

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/F97N/ins97aE/T98S/F99L/C122S/G151H/
Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/
Q192D,

и те же самые модификации за исключением того, что C122S не была
модифицирована и представляет собой C122C.

43. Модифицированный полипептид MTSP–1 по любому из пп. 1–42, содержащий
модификации, соответствующие:

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q17
5L/Q192D или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/G151H/Q175L/Q192D,
где немодифицированный полипептид MTSP–1 содержит протеазный домен, указанный в
SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

44. Модифицированный полипептид MTSP–1 по любому из пп. 1–42, содержащий
модификации, соответствующие модификациям из I41D/C122S/G151N/Q192T или
I41D/G151N/Q192T или I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T или I41E/F99L/G151N/Q192T, где
немодифицированный полипептид MTSP–1 содержит протеазный домен, указанный в SEQ
ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

45. Модифицированный полипептид MTSP–1 по любому из пп. 1–4, где
модифицированный полипептид MTSP–1 содержит последовательность аминокислотных
остатков, указанную в любой из SEQ ID NO: 6, 8, 21–59 и 63–81 ,

46. Модифицированный полипептид MTSP–1 по любому из пп. 1–45, где
модифицированный полипептид MTSP–1 содержит последовательность аминокислотных
остатков, указанную в SEQ ID NO: 35.

47. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–46, где немодифицированный полипептид MTSP-1 состоит из последовательности аминокислотных остатков, указанной в SEQ ID NO: 2 или 4 (протеазный домен).

48. Модифицированный полипептид MTSP-1 по п. 34, где немодифицированный полипептид MTSP-1 состоит из последовательности аминокислотных остатков, указанной в SEQ ID NO: 2 или 4.

49. Модифицированный полипептид MTSP-1 по п. 35, где немодифицированный полипептид MTSP-1 состоит из последовательности аминокислотных остатков, указанной в SEQ ID NO: 2 или 4.

50. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–49, который расщепляет в остатках QHARASHL (остатки 737–744) человеческий C3 (SEQ ID NO:9).

51. Модифицированный полипептид MTSP-1 по п. 50, где P1–P1' представляет собой RA.

52. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–51, который модифицирован полимером для увеличения периода полужизни в сыворотке и/или для снижения иммуногенности, или того и другого.

53. Модифицированный полипептид MTSP-1 по п. 52, который является ПЭГилированным.

54. Слитый белок, содержащий модифицированный полипептид MTSP-1 или каталитически активную часть модифицированного полипептида MTSP-1 по любому из пп. 1–53, который слит с полипептидом, не являющимся полипептидом MTSP-1–протеазы, или с его частью.

55. Слитый белок по п. 54, где непротеазный полипептид представляет собой домен мультимеризации или домен белковой трансдукции (PTD).

56. Слитый белок по п. 55, где непротеазный полипептид представляет собой домен мультимеризации, который представляет собой Fc домен.

57. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность аминокислотных остатков, кодирующую модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–53 или слитый белок по любому из пп. 54–56.

58. Вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 57.

59. Вектор по п. 58, который является прокариотическим вектором.

60. Вектор по п. 58, который является эукариотическим вектором.

61. Вектор по п. 58, который представляет собой вирусный вектор.

62. Вектор по п. 58, который представляет собой дрожжевой вектор.

63. Вектор по любому из пп. 58, 60 и 61, который является вектором простого вируса герпеса, или вектором вируса коровьей оспы, или аденовирусным вектором, или ретровирусным вектором, или вектором насекомых.

64. Вектор по любому из пп. 58–63, который является вектором экспрессии.

65. Вектор по любому из пп. 58–64, который представляет собой вектор генной терапии.

66. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по п. 57 или вектора по любому из пп. 58–65 для генной терапии для лечения заболевания или состояния, связанного с активацией комплемента или вовлеченного в активацию комплемента, где ингибирование эффекта активации комплемента влияет на лечение или улучшение заболевания или состояния..

67. Способ лечения заболевания или состояния, опосредованного или включающего активацию комплемента, включающий введение субъекту вектора по любому из пп. 58 или введение молекулы нуклеиновой кислоты по п. 57 для лечения заболевания или состояния.

68. Способ по п. 67, в котором опосредованное комплементом заболевание или расстройство выбирают из числа воспалительных заболеваний и состояний, сепсиса, ревматоидного артрита (RA), глазного или офтальмологического заболевания или расстройства, сердечно-сосудистого заболевания, мембранопролиферативного гломерулонефрита (MPGN), рассеяного склероза (MS), миастении (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, острого воспалительного повреждения тканей, вызванного иммунным комплексом (IC), болезни Альцгеймера (AD), отторжения трансплантированного органа и синдрома ишемии-реперфузии.

69. Способ по п. 67 или 68, в котором заболевание или состояние представляет собой глазное или офтальмологическое заболевание или отторжение трансплантированного органа или воспаление, обусловленное трансплантированным органом.

70. Способ по п. 68, где заболевание или состояние представляет собой диабетическую ретинопатию или дегенерацию желтого пятна.

71. Способ по п. 70, где заболевание или состояние представляет собой дегенерацию желтого пятна.

72. Способ по п. 71, в котором дегенерация желтого пятна представляет собой возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD).

73. Способ по любому из пп. 67–69, где заболевание или состояние представляет собой отсроченную функцию трансплантата (DGF) почки.

74. Применение по п. 66, где опосредованное комплементом заболевание или расстройство, выбранно из сепсиса, ревматоидного артрита (RA), глазного заболевания,

мембранопролиферативного гломерулонефрита (MPGN), рассеянного склероза (MS), миастении (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, острого воспалительного повреждения тканей, вызванного иммунным комплексом (IC), болезни Альцгеймера (AD) и синдрома ишемии-реперфузии.

75. Применение по п. 66 или 74, где заболевание или состояние представляет собой глазное или офтальмологическое заболевание или отторжение трансплантированного органа или воспаление, обусловленное трансплантированным органом.

76. Применение по п. 66, где заболевание или состояние представляет собой диабетическую ретинопатию или дегенерацию желтого пятна.

77. Применение по п. 76, где заболевание или состояние представляет собой дегенерацию желтого пятна.

78. Применение по п. 77, где дегенерация желтого пятна представляет собой возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD).

79. Применение по п. 74, где заболевание или состояние представляет собой отсроченную функцию трансплантата (DGF) почки.

80. Изолированная клетка или клеточная культура, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 57 или вектор по любому из пп. 58–65.

81. Изолированная клетка, не являющаяся человеческой, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 57 или вектора по любому из пп. 58–65.

82. Изолированная клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 57 или вектор по любому из пп. 58–65, где изолированная клетка не является зиготой человека.

83. Способ ингибирования активации комплемента, включающий контактирование модифицированного полипептида MTSP-1 по любому из пп. 1–53 или слитого белка по любому из пп. 54–56 с белком комплемента C3, в результате которого белок комплемента C3 расщепляется так, что активация комплемента уменьшается или ингибируется.

84. Способ по п. 83, в котором контактирование модифицированного полипептида MTSP-1 с белком комплемента C3 осуществляют *in vitro*.

85. Способ по п. 83, в котором контактирование модифицированного полипептида MTSP-1 с белком комплемента C3 осуществляют *in vivo*.

86. Способ по любому из пп. 83–85, в котором ингибирование активации комплемента приводит к уменьшению воспалительных симптомов, связанных с опосредованным комплементом заболеванием или расстройством, выбранным из воспалительного расстройства, нейродегенеративного расстройства и сердечно-сосудистого расстройства.

87. Способ по п. 86, в котором опосредованное комплементом заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из сепсиса, ревматоидного артрита (RA), глазных расстройств, мембранопролиферативного гломерулонефрита (MPGN), рассеянного склероза (MS), миастении (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, острого воспалительного повреждения тканей, вызванного иммунным комплексом (IC), болезни Альцгеймера (AD) и синдрома ишемии–реперфузии.

88. Способ по п. 87, в котором синдром ишемии-реперфузии вызван событием или лечением, выбранным из числа инфаркта миокарда (ИМ), инсульта, ангиопластики, шунтирования коронарной артерии, шунтирования легкого (ЦПБ) и гемодиализа.

89. Способ по любому из пп. 83–88, в котором опосредованное комплементом заболевание или расстройство возникает в результате лечения субъекта.

90. Способ по п. 89, где лечение модифицированным полипептидом MTSP–1 осуществляют до лечения субъекта, которое привело к опосредованному комплементом заболеванию или расстройству.

91. Способ лечения заболевания или состояния, опосредованного или включающего активацию комплемента, который включает введение модифицированного полипептида MTSP–1 по любому из пп. 1–53 или слитого белка по любому из пп. 54–56, в котором ингибирование активации комплемента влияет на лечение или улучшение заболевания или состояния.

92. Способ по п. 91, в котором опосредованное комплементом заболевание или расстройство выбрано из сепсиса, ревматоидного артрита (RA), глазного заболевания, мембранопролиферативного гломерулонефрита (MPGN), рассеянного склероза (MS), миастении (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, острого воспалительного повреждения тканей, связанного с иммунным комплексом (IC), болезни Альцгеймера (AD) и синдрома ишемии-реперфузии.

93. Способ по п. 91 или 92, в котором заболевание или состояние представляет собой заболевание глаз или отторжение или воспаление вследствие трансплантированного органа.

94. Способ по п. 93, где заболевание или состояние представляет собой диабетическую ретинопатию или дегенерацию желтого пятна.

95. Способ по п.94, где заболевание или состояние представляет собой дегенерацию желтого пятна.

96. Способ по п.95, в котором дегенерация желтого пятна представляет собой возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD).

97. Способ по п.93, где заболевание или состояние представляет собой отсроченную функцию трансплантата (DGF) почки.

98. Способ или применение по любому из пп. 66–79 и 83–97, где модифицированный полипептид MTSP–1 или слитый белок или кодирующая молекула нуклеиновой кислоты или вектор вводятся внутривенно.

99. Способ или применение по любому из пп. 66–79 и 83–97, где модифицированный полипептид MTSP–1 или слитый белок или кодирующую молекулу нуклеиновой кислоты или вектор вводят подкожно.

100. Способ или применение по любому из пп. 66–79 и 83–97, где модифицированный полипептид MTSP–1 или слитый белок или кодирующая молекула нуклеиновой кислоты или вектор вводятся в глаз.

101. Способ или применение по п. 100, где введение в глаз осуществляется посредством интравитреальной инъекции.

102. Способ или применение по п. 101, где модифицированный полипептид MTSP–1 связан с доменом трансдукции для облегчения трансдукции в стекловидное тело.

103. Способ или применение по любому из пп. 66–79 и 83–102, где модифицированный полипептид MTSP–1 является ПЭГилированным.

104. Комбинация, включающая:

(а) модифицированный полипептид MTSP–1 по любому из пп. 1–53 или слитый белок по любому из пп. 54–56; и

(б) второй агент или агенты для лечения опосредованного комплементом заболевания или расстройства.

105. Комбинация по п.104, в которой второй агент или агенты представляют собой противовоспалительный агент (ы) или антикоагулянт (ы).

106. Комбинация по п.105, где второй агент представляет собой противовоспалительный агент (ы), выбранный из любого одного или нескольких нестероидных противовоспалительных препаратов (NSAID), антиметаболитов, кортикостероидов, анальгетиков, цитотоксических агентов, про-ингибиторов воспалительных цитокинов, противовоспалительных цитокинов, агентов, нацеленных на В-клетки, соединения, нацеленные на антигены Т блокаторы молекул адгезии, антагонистов хемокиновых рецепторов, ингибиторов киназы, лигандов PPAR–γ (гамма), ингибиторов комплемента, гепарина, варфарина, аценокумарола, фениндиона, ЭДТА цитрата, оксалата, аргатробана, лепирудина, бивалирудина и ксимелагатрана.

107. Способ, применение или комбинация по любому из пп. 66–79 и 83–106, где модифицированный полипептид MTSP–1 включает модификацию I41D или I41S.

108. Способ, применение или комбинация по любому из пп. 66–79 и 83–107, где модифицированный полипептид MTSP–1 включает модификацию I41S.

109. Способ, применение или комбинация по любому из пп. 66–79 и 83–108, где модифицированный полипептид MTSP–1 содержит модификации: Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, или Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/G151H/Q175L/Q192D.

110. Способ, использование или комбинация по любому из пп. 66–79 и 83–107, где модифицированный полипептид MTSP–1 содержит модификации: I41D/C122S/G151N/Q192T или I41D/G151N/Q192T.

111. Способ, применение или комбинация по любому из пп. 66–79 и 83–110, где немодифицированный полипептид MTSP–1 содержит последовательность аминокислотных остатков, указанных в SEQ ID NO: 4.

112. Модифицированный полипептид MTSP–1 по любому из пп. 1–53 или слитый белок по любому из пп.54–56, или способ, применение или комбинация по любому из пп. 66–79 и 83–110, где модифицированный MTSP–1 полипептид содержит последовательность аминокислотных остатков, представленную в любой из SEQ ID NO: 35 и 42.

113. Способ лечения DGF, включающий внутривенное введение модифицированного полипептида MTSP–1 по любому из пп.1–53 или слитого белка по любому из пп.54–56.

114. Способ по п.113, где разовая дозировка составляет от 0,1 до 1 мг.

115. Способ по п.113 или 114, в котором модифицированный полипептид MTSP–1 содержит последовательность аминокислотных остатков, указанных в любой из SEQ ID NO: 35 и 42.

116. Способ по любому из пп. 113–115, в котором лечение повторяют множество раз.

117. Способ по любому из пп.113–116, в котором лечение повторяют каждые 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, еженедельно, раз в два месяца или ежемесячно.

118. Способ по любому из пп.113–111, в котором модифицированный полипептид MTSP–1 содержит замены Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D.

119. Способ по любому из пп. 113–11, в котором модифицированный полипептид MTSP–1 содержит протеазный домен, указанный в SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 42, или его каталитически активную часть.

120. Способ лечения глазного расстройства или офтальмологического расстройства, включающий введение в глаз модифицированного полипептида MTSP-1 по любому из пп. 1–53.

121. Способ по п. 120, где расстройством является дегенерация желтого пятна или диабетическая ретинопатия.

122. Способ по п. 121, в котором расстройство представляет собой AMD.

123. Способ по п. 120, где разовая дозировка составляет от 0,1 до 1 мг.

124. Способ по любому из пп. 120–123, в котором модифицированный полипептид MTSP-1 содержит последовательность аминокислотных остатков, представленную в любой из SEQ ID NO: 35 и 42.

125. Способ по любому из пп. 120–124, в котором лечение повторяют множество раз.

126. Способ по любому из пп. 120–125, в котором лечение повторяют каждые 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, еженедельно, раз в два месяца или ежемесячно.

127. Способ по любому из пп. 120–126, в котором модифицированный полипептид MTSP-1 содержит замены

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/G151H/Q175L/Q192D.

128. Способ по любому из пп. 111–117, в котором модифицированный полипептид MTSP-1 содержит замены I41D/C122S/G151N/Q192T или I41D/G151N/Q192T.

129. Способ по любому из пп. 111–117, в котором модифицированный полипептид MTSP-1 содержит протеазный домен с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 35, или его каталитически активную часть.

130. Применение модифицированного полипептида MTSP-1 для лечения AMD или DGF, где модифицированный полипептид MTSP-1 содержит замены Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/G151H/Q175L/Q192D или I41D/C122S/G151N/Q192T или I41D/G151N/Q192T.

131. Применение модифицированного полипептида MTSP-1 по любому из пп. 1–53 или слитого белка по любому из пп. 54–56 для ингибирования активации комплемента.

132. Применение по п. 131, в котором:

модифицированный полипептид MTSP-1 контактирует с белком комплемента C3, в результате чего белок комплемента C3 расщепляется так, что активация комплемента уменьшается или ингибируется; и

контактирование модифицированного полипептида MTSP-1 с белком комплемента C3 осуществляется *in vitro* или у животного, не являющегося человеком.

133. Применение по п. 131, где контактирование модифицированного полипептида MTSP-1 с белком комплемента C3 осуществляют *in vivo*.

134. Применение по любому из пп. 131–133, где ингибирование активации комплемента приводит к уменьшению воспалительных симптомов, ассоциированных со связанными с с комплементом опосредованным комплементом заболеванием или расстройством, выбранным из воспалительного расстройства, нейродегенеративного расстройства и сердечно–сосудистого расстройства.

135. Применение по п. 134, в котором связанное с комплементом заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из сепсиса, ревматоидного артрита (RA), глазных расстройств, мембранопролиферативного гломерулонефрита (MPGN), рассеянного склероза (MS), миастении (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, иммунного комплекса (IC) опосредованное острым воспалительным повреждением тканей, болезнью Альцгеймера (AD) и синдрома ишемии–реперфузии.

136. Применение по п. 135, в котором синдром ишемии–реперфузии вызван с заболеванием или лечением заболевания, выбранного из группы, состоящей из инфаркта миокарда, инсульта, ангиопластики, шунтирования коронарной артерии, шунтирования сердца (ЦПБ) и гемодиализа.

137. Применение по любому из пп. 131–136, где заболевание или расстройство, опосредованное комплементом, является результатом лечения субъекта.

138. Применение по любому из пп. 131–137, в котором лечение модифицированным полипептидом MTSP-1 осуществляют до лечения субъекта.

139. Применение модифицированного полипептида MTSP-1 по любому из пп. 1–53 или слитого белка по любому из пп. 54–56 для лечения заболевания или состояния, связанного с активацией комплемента или включающего активацию комплемента, где ингибирование активации комплемента влияет на лечение или улучшение заболевания или состояния.

140. Применение по п. 139, в котором связанное с комплементом заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита (RA), заболевания глаз, мембранопролиферативного гломерулонефрита (MPGN), рассеянного склероза (MS), миастении (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, острого воспалительного повреждения тканей, вызванного иммунным комплексом (ИК/IC), болезни Альцгеймера (AD) и синдрома ишемии–гиперфузии.

141. Применение по п. 140, где заболевание или состояние представляет собой заболевание глаз или представляет собой отторжение или воспаление вследствие трансплантированного органа.

142. Применение по п. 141, где заболевание или состояние представляет собой диабетическую ретинопатию или макулярную дегенерацию.

143. Применение по п. 142, где заболевание или состояние представляет собой макулярную дегенерацию.

144. Применение по п. 143, в котором макулярная дегенерация представляет собой возрастную макулярную дегенерацию (AMD).

145. Применение по п. 141, в котором, заболевание или состояние представляет собой отсроченную функцию трансплантата (DGF) почки.

146. Применение по любому из пп. 131–145, где модифицированный полипептид MTSP–1 содержит модификации:

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D или I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T.

147. Применение по п. 145, где модифицированный полипептид MTSP–1 содержит модификации:

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D.

148. Применение по п. 145, где модифицированный полипептид MTSP–1 содержит модификации: I41D/C122S/G151N/Q192T.

149. Способ получения модифицированного полипептида MTSP–1, включающий: введение в клетку нуклеиновой кислоты или вектора, кодирующего модифицированный полипептид MTSP–1 по любому из пп. 1–53 или слитый белок по любому из пп. 54–56;

культивирование клетки в условиях, при которых полипептид экспрессируется; и, необязательно, выделение экспрессированного полипептида.

150. Способ по п. 149, где клетка представляет собой эукариотическую клетку.

151. Способ по п. 150, где клетка представляет собой клетку млекопитающего или клетку дрожжей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ, измененная согласно статье 34(2)(b)РСТ

1. Модифицированный полипептид сериновой протеазы 1 мембранного типа (MTSP-1), содержащий одну или более из следующих модификаций аминокислот (ы): I41S, Q38H, D60bT, F60eS или R, Y60gW, ins97aV, D96K, F97G, G151H или N и Q192T, за счет чего модифицированный полипептид MTSP-1 обладает повышенной активностью/специфичностью в отношении белка C3 комплемента по сравнению с немодифицированной активной формой полипептида MTSP-1, где:

модификации аминокислот выбраны из замен, вставок и/или делеций в немодифицированном полипептиде MTSP-1;

модифицированный полипептид MTSP-1 расщепляет целевой сайт белка C3 комплемента человека, что инактивирует C3;

модифицированный полипептид MTSP-1 расщепляет белок C3 комплемента, чтобы тем самым ингибировать или уменьшать активацию комплемента по сравнению с активной формой немодифицированного полипептида MTSP-1, который не содержит модификацию(и) аминокислот(ы);

аминокислотные остатки нумеруются химотрипсиновой нумерацией; где

соответствующие аминокислотные остатки определяются и нумеруются выравниванием по химотрипсину; и где

немодифицированный полипептид MTSP-1 содержит последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO: 1-4, или ее каталитически активный фрагмент или форму, которая включает модификацию(и) аминокислот(ы).

2. Модифицированный полипептид сериновой протеазы 1 мембранного типа (MTSP-1), содержащий модификации аминокислот, которые увеличивают активность/специфичность расщепления белка C3 комплемента человека по сравнению с немодифицированной активной формой полипептида MTSP-1, где:

расщепление C3 происходит между остатками 740 и 741 SEQ ID NO: 9, в результате чего расщепление происходит при Q H A R ↓ A S H L, остатки 737-744 SEQ ID NO: 9, с EC₅₀ 10 нМ или менее *in vitro*;

модифицированный полипептид MTSP-1 расщепляет белок C3 комплемента, тем самым ингибируя или уменьшая активацию комплемента по сравнению с активной формой немодифицированного полипептида MTSP-1, который не содержит модификацию (и) аминокислот (ы);

модифицированный MTSP-1 содержит по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5, или по меньшей мере 6, или по меньшей мере 7 модификаций аминокислот;

модификации аминокислот выбраны из замен, вставок и/или делеций в немодифицированном полипептиде MTSP-1;

модифицированный MTSP-1 содержит замену, выбранную из одной или более из: I41S, Q38H, D60bT, F60eS or R, Y60gW, ins97aV, D96K, F97G, G151H или N и Q192T; и

немодифицированный полипептид MTSP-1 содержит последовательность аминокислот, указанную в любой из SEQ ID NO: 1-4, или ее каталитически активный фрагмент или форму, которая включает модификацию (и) аминокислот.

3. Модифицированный полипептид MTSP-1 по п. 1 или п. 2, где модифицированный MTSP-1 содержит I41S, Q38H, D60bT, F60eS или R, Y60gW, ins97aV, D96K, F97G, G151H и Q192T.

4. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1-3, который содержит замены I41S и Q38H.

5. Модифицированный полипептид MTSP-1 по п. 1 или п. 3, где целевой сайт содержит остатки 737-744 белка C3 комплемента.

6. Модифицированный полипептид MTSP-1 по п. 1, где расщепление происходит между остатками 740 и 741 SEQ ID NO: 9, посредством чего расщепление происходит в Q H A R ↓ A S H L.

7. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1-6, в котором часть, соответствующая протеазному домену полипептида MTSP-1, обладает повышенной активностью в отношении расщепления C3, которая по меньшей мере в 1 раз больше или более чем в 1 раз больше активности полипептида MTSP-1 с SEQ ID NO: 4; и где последовательность аминокислот протеазного домена полипептида MTSP-1, которая соответствует указанной части, приведена в SEQ ID NO: 2.

8. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1-7, в котором активность оценивают *in vitro* путем протеолиз-опосредованного ингибирования или инактивации белка C3 комплемента, или путем анализа активности комплемента в сыворотке крови в гемолитическом анализе или путем определения значений ED₅₀ протеазного домена модифицированного полипептида MTSP-1 по сравнению с протеазным доменом немодифицированного полипептида MTSP-1 с SEQ ID NO: 4.

9. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1-8, который обладает повышенной активностью в отношении расщепления C3, которая по меньшей мере в 1,2 раза или по меньшей мере в 1,5 раза превышает активность немодифицированного полипептида MTSP-1 с SEQ ID NO: 4.

10. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–8, который обладает повышенной активностью в отношении расщепления C3, которая по меньшей мере в 3 раза или по меньшей мере в 4 раза превышает активность немодифицированного полипептида MTSP-1 с SEQ ID NO: 4.

11. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–10, где немодифицированный полипептид MTSP-1 состоит из последовательности аминокислот, представленной в любой из SEQ ID NO: 1–4.

12. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–10, где немодифицированный полипептид MTSP-1 состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 4.

13. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–10, где модифицированный полипептид MTSP-1 имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с полипептидами, представленными в любой из SEQ ID NO: 1–4.

14. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–13, где модифицированный полипептид MTSP-1 имеет 1 или до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен, вставок или делеций по сравнению с немодифицированным полипептидом MTSP-1, представленным в любой из SEQ ID NO: 1–6, или его каталитически активной частью.

15. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–14, содержащий модификацию, соответствующую I41S.

16. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–15, содержащий модификацию, соответствующую Q38H.

17. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–16, содержащий модификацию, соответствующую D60bT.

18. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–17, содержащий модификацию, соответствующую F60eS.

19. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–18, содержащий модификацию, соответствующую Y60gW.

20. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–19, содержащий модификацию, соответствующую ins97aV.

21. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–20, содержащий модификацию, соответствующую D96K.

22. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–21, содержащий модификацию, соответствующую F97G.

23. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–22, содержащий модификацию, соответствующую G151H.

24. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–22, содержащий модификацию, соответствующую G151N.

25. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–24, содержащий модификацию, соответствующую Q192T.

26. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–24, содержащий модификацию, соответствующую Q192D.

27. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–24, содержащий модификацию, соответствующую Q192E.

28. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–17 и 19–27, содержащий модификацию, соответствующую F60eR.

29. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–28, дополнительно содержащий модификацию, соответствующую Y59F.

30. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–29, дополнительно содержащий модификацию, соответствующую F99L.

31. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–30, дополнительно содержащий модификацию, соответствующую T98P.

32. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–31, дополнительно содержащий модификацию, соответствующую Q175L.

33. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–32, дополнительно содержащий модификацию в положении, соответствующем D217.

34. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–32, дополнительно содержащий модификацию, соответствующую D217V, I, L, W или M.

35. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–14 и 16–34, дополнительно содержащий модификацию, соответствующую I41D, E, T, G или R.

36. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–14, содержащий модификации, соответствующие I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T или I41D/C122S/G151N/Q192T или I41S/F99L/C122S/G151N/Q192V или I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T; или те же самые модификации, за исключением того, что C122S представляет собой C122C.

37. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–14, содержащий модификации, соответствующие модификациям I41R/F97T/Ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E, или модификациям I41R/F97T/Ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D.

38. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–14, содержащий модификации, соответствующие: I41D/Y59F/D96E/F99L/C122S/G151N/Q192T, или соответствующие I41D/Y59F/C122S/G151N/Q192T.

39. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп.1–38, содержащий модификации, соответствующие любой из:

I41R/F97T/Ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192E, или

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,

или

Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,

или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E,

или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

или

Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,

или

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

или

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97Y/ins97aN/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/

Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/

Q192D, или

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/F97W/ins97aN/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/

Q192E, или

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/F97E/ins97aV/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/

Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96L/F97D/ins97aG/T98N/F99L/C122S/G151H/Q175L/

Q192E, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/

Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96V/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/

Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L, или

I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T, или I41D/C122S/G151N/Q192T, или

I41S/F99L/C122S/G151N/Q192V, или I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T, или

I41D/Y59F/D96E/F99L/C122S/G151N/Q192T, или I41D/Y59F/C122S/G151N/Q192T, или

I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, или

Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, или

Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/C122S/G151H/Q175L/Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q192D, или

Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D, или

I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, или

I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D, или

Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, или

Q38H/I41S/D60bY/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D/D217V, или

I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V, или

I41S/D60bY/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192D/D217V, или
 I41S/D96M/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V, или
 I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192V/D217I, или
 I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192H, или
 I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192N/D217V, или
 I41S/D60bY/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, или
 Q38H/I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V, или
 I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192V, или
 I41S/P49S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q192G/D217V, или
 I41S/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192N/D217V, или
 I41T/F97W/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192G/D217L, или
 I41G/F97L/F99L/C122S/Q175A/Q192T/D217V, или
 I41G/F97V/F99L/C122S/G151Q/Q175M/Q192A/D217L, или
 I41G/F97I/F99L/C122S/G151L/Q175M/Q192S/D217V, или
 I41G/F97S/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G/D217I, или
 I41T/F97L/F99L/C122S/G151N/Q175S/Q192S/D217W, или
 I41D/F97T/F99M/C122S/Q192V/D217M, или

те же самые модификации за исключением того, что C122S не модифицирована и представляет собой C122C.

40. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп.1-38, включающий модификации, выбранные из комбинаций, включающих одну или несколько модификаций Q38H, I41S, D60bT, F60eS, Y60gW, D96K, F97G, Ins97aV и G151H, а именно из:

G151H, Ins97aV, Ins97aV/G151H, F97G, F97G/G151H, F97G/Ins97aV,
 F97G/Ins97aV/G151H, D96K, D96K/G151H, D96K/Ins97aV, D96K/Ins97aV/G151H,
 D96K/F97G, D96K/F97G/G151H, D96K/F97G/Ins97aV, D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 Y60gW, Y60gW/G151H, Y60gW/Ins97aV, Y60gW/Ins97aV/G151H, Y60gW/F97G,
 Y60gW/F97G/G151H, Y60gW/F97G/Ins97aV, Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Y60gW/D96K,
 Y60gW/D96K/G151H, Y60gW/D96K/Ins97aV, Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H,
 Y60gW/D96K/F97G, Y60gW/D96K/F97G/G151H, Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, F60eS, F60eS/G151H, F60eS/Ins97aV,
 F60eS/Ins97aV/G151H, F60eS/F97G, F60eS/F97G/G151H, F60eS/F97G/Ins97aV,
 F60eS/F97G/Ins97aV/G151H, F60eS/D96K, F60eS/D96K/G151H, F60eS/D96K/Ins97aV,
 F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, F60eS/D96K/F97G, F60eS/D96K/F97G/G151H,
 F60eS/D96K/F97G/Ins97aV, F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, F60eS/Y60gW,
 F60eS/Y60gW/G151H, F60eS/Y60gW/Ins97aV, F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H,

F60eS/Y60gW/F97G, F60eS/Y60gW/F97G/G151H, F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, F60eS/Y60gW/D96K, F60eS/Y60gW/D96K/G151H,
 F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV, F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H,
 F60eS/Y60gW/D96K/F97G, F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV, F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, D60bT,
 D60bT/G151H, D60bT/Ins97aV, D60bT/Ins97aV/G151H, D60bT/F97G, D60bT/F97G/G151H,
 D60bT/F97G/Ins97aV, D60bT/F97G/Ins97aV/G151H, D60bT/D96K, D60bT/D96K/G151H,
 D60bT/D96K/Ins97aV, D60bT/D96K/Ins97aV/G151H, D60bT/D96K/F97G,
 D60bT/D96K/F97G/G151H, D60bT/D96K/F97G/Ins97aV,
 D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, D60bT/Y60gW, D60bT/Y60gW/G151H,
 D60bT/Y60gW/Ins97aV, D60bT/Y60gW/Ins97aV/G151H, D60bT/Y60gW/F97G,
 D60bT/Y60gW/F97G/G151H, D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, D60bT/Y60gW/D96K, D60bT/Y60gW/D96K/G151H,
 D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV, D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H,
 D60bT/Y60gW/D96K/F97G, D60bT/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV, D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 D60bT/F60eS, D60bT/F60eS/G151H, D60bT/F60eS/Ins97aV, D60bT/F60eS/Ins97aV/G151H,
 D60bT/F60eS/F97G, D60bT/F60eS/F97G/G151H, D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV,
 D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H, D60bT/F60eS/D96K, D60bT/F60eS/D96K/G151H,
 D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV, D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H,
 D60bT/F60eS/D96K/F97G, D60bT/F60eS/D96K/F97G/G151H,
 D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV, D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 D60bT/F60eS/Y60gW, D60bT/F60eS/Y60gW/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/F97G,
 D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/D96K,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H, D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S, I41S/G151H, I41S/Ins97aV,
 I41S/Ins97aV/G151H, I41S/F97G, I41S/F97G/G151H, I41S/F97G/Ins97aV,
 I41S/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D96K, I41S/D96K/G151H, I41S/D96K/Ins97aV,
 I41S/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/D96K/F97G, I41S/D96K/F97G/G151H,
 I41S/D96K/F97G/Ins97aV, I41S/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/Y60gW,
 I41S/Y60gW/G151H, I41S/Y60gW/Ins97aV, I41S/Y60gW/Ins97aV/G151H,

I41S/Y60gW/F97G, I41S/Y60gW/F97G/G151H, I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/Y60gW/D96K, I41S/Y60gW/D96K/G151H,
 I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV, I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/Y60gW/D96K/F97G,
 I41S/Y60gW/D96K/F97G/G151H, I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/F60eS, I41S/F60eS/G151H,
 I41S/F60eS/Ins97aV, I41S/F60eS/Ins97aV/G151H, I41S/F60eS/F97G,
 I41S/F60eS/F97G/G151H, I41S/F60eS/F97G/Ins97aV, I41S/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H,
 I41S/F60eS/D96K, I41S/F60eS/D96K/G151H, I41S/F60eS/D96K/Ins97aV,
 I41S/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/F60eS/D96K/F97G, I41S/F60eS/D96K/F97G/G151H,
 I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV, I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 I41S/F60eS/Y60gW, I41S/F60eS/Y60gW/G151H, I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, I41S/F60eS/Y60gW/F97G,
 I41S/F60eS/Y60gW/F97G/G151H, I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/F60eS/Y60gW/D96K,
 I41S/F60eS/Y60gW/D96K/G151H, I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G,
 I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H, I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT, I41S/D60bT/G151H,
 I41S/D60bT/Ins97aV, I41S/D60bT/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F97G,
 I41S/D60bT/F97G/G151H, I41S/D60bT/F97G/Ins97aV, I41S/D60bT/F97G/Ins97aV/G151H,
 I41S/D60bT/D96K, I41S/D60bT/D96K/G151H, I41S/D60bT/D96K/Ins97aV,
 I41S/D60bT/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/D96K/F97G,
 I41S/D60bT/D96K/F97G/G151H, I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV,
 I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/Y60gW, I41S/D60bT/Y60gW/G151H,
 I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV, I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV/G151H,
 I41S/D60bT/Y60gW/F97G, I41S/D60bT/Y60gW/F97G/G151H,
 I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV, I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H,
 I41S/D60bT/Y60gW/D96K, I41S/D60bT/Y60gW/D96K/G151H,
 I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV, I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H,
 I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G, I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV, I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 I41S/D60bT/F60eS, I41S/D60bT/F60eS/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS/F97G,
 I41S/D60bT/F60eS/F97G/G151H, I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS/D96K,

I41S/D60bT/F60eS/D96K/G151H, I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G,
 I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/G151H, I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H, Q38H/G151H,
 Q38H/Ins97aV, Q38H/Ins97aV/G151H, Q38H/F97G, Q38H/F97G/G151H,
 Q38H/F97G/Ins97aV, Q38H/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D96K, Q38H/D96K/G151H,
 Q38H/D96K/Ins97aV, Q38H/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/D96K/F97G,
 Q38H/D96K/F97G/G151H, Q38H/D96K/F97G/Ins97aV, Q38H/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/Y60gW, Q38H/Y60gW/G151H, Q38H/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/Y60gW/F97G, Q38H/Y60gW/F97G/G151H,
 Q38H/Y60gW/F97G/Ins97aV, Q38H/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/Y60gW/D96K,
 Q38H/Y60gW/D96K/G151H, Q38H/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/Y60gW/D96K/F97G,
 Q38H/Y60gW/D96K/F97G/G151H, Q38H/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS, Q38H/F60eS/G151H,
 Q38H/F60eS/Ins97aV, Q38H/F60eS/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS/F97G,
 Q38H/F60eS/F97G/G151H, Q38H/F60eS/F97G/Ins97aV, Q38H/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/F60eS/D96K, Q38H/F60eS/D96K/G151H, Q38H/F60eS/D96K/Ins97aV,
 Q38H/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS/D96K/F97G,
 Q38H/F60eS/D96K/F97G/G151H, Q38H/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW,
 Q38H/F60eS/Y60gW/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/F97G,
 Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/D96K,
 Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,

Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G,
 Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H, Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT, Q38H/D60bT/G151H,
 Q38H/D60bT/Ins97aV, Q38H/D60bT/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F97G,
 Q38H/D60bT/F97G/G151H, Q38H/D60bT/F97G/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/D96K, Q38H/D60bT/D96K/G151H,
 Q38H/D60bT/D96K/Ins97aV, Q38H/D60bT/D96K/Ins97aV/G151H,
 Q38H/D60bT/D96K/F97G, Q38H/D60bT/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV, Q38H/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/D60bT/Y60gW, Q38H/D60bT/Y60gW/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/F97G,
 Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/D96K,
 Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G,
 Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/G151H, Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS,
 Q38H/D60bT/F60eS/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/F97G,
 Q38H/D60bT/F60eS/F97G/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/D96K,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/G151H, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G, Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S, Q38H/I41S/G151H,
 Q38H/I41S/Ins97aV, Q38H/I41S/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F97G,

Q38H/I41S/F97G/G151H, Q38H/I41S/F97G/Ins97aV, Q38H/I41S/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/D96K, Q38H/I41S/D96K/G151H, Q38H/I41S/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D96K/F97G, Q38H/I41S/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/I41S/D96K/F97G/Ins97aV, Q38H/I41S/D96K/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/Y60gW, Q38H/I41S/Y60gW/G151H, Q38H/I41S/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/I41S/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/Y60gW/F97G,
 Q38H/I41S/Y60gW/F97G/G151H, Q38H/I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/Y60gW/D96K,
 Q38H/I41S/Y60gW/D96K/G151H, Q38H/I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G,
 Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/G151H, Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS,
 Q38H/I41S/F60eS/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Ins97aV, Q38H/I41S/F60eS/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/F60eS/F97G, Q38H/I41S/F60eS/F97G/G151H, Q38H/I41S/F60eS/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS/D96K,
 Q38H/I41S/F60eS/D96K/G151H, Q38H/I41S/F60eS/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G,
 Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/G151H, Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H, Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT,
 Q38H/I41S/D60bT/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Ins97aV, Q38H/I41S/D60bT/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F97G, Q38H/I41S/D60bT/F97G/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/D96K,
 Q38H/I41S/D60bT/D96K/G151H, Q38H/I41S/D60bT/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G,
 Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/G151H, Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW,

Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F60eS,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/G151H, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K, Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/G151H,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/G151H и те же самые модификации
 за исключением того, что C122S не модифицирована и представляет собой C122C.

41. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–38, включающий модификации, выбранные из комбинаций, которые включают T98P/F99L/Q175L/Q192D, необязательно C122S, и одну или более модификаций, выбранных из: Q38H, I41S, D60bT, F60eS, Y60gW, D96K, F97G, Ins97aV и G151H, а именно:

T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, D60bT/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, I41S/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 I41S/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 I41S/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

I41S/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

I41S/D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, Q38H/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, Q38H/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D, Q38H/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/Ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/
 Q19 2D и те же самые модификации за исключением того, что C122S не модифицирована
 и представляет собой C122C.

42. Модифицированный полипептид MTSP–1 по любому из пп. 1–38, включающий модификации, выбранные из комбинаций модификаций MTSP–1, в которых протеазный домен расщепляет человеческий C3 *in vitro* с EC₅₀ менее 10 нМ:

ins97aA/F97G/T98L/C122S/Q175M/Q192A/D217I/K224R,
 Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q
 192E,
 Q38G/H40R/I41H/D60bN/F97D/F99L/C122S/Q175L/Q192G,
 Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/
 Q192E,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96F/F97D/ins97aE/T98S/F99L/C122S/G151H/Q175L/
 Q192A,
 Q38F/I41A/D60bT/F60eG/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eT/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192E,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/
 Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L,

Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/
 Q192E,
 Q38Y/I41A/D60bL/F60eQ/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192A,
 Q38H/I41S/D60bF/F60eV/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192A,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eA/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192V,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/ins97aN/F97Y/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/
 Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96L/ins97aG/F97D/T98N/F99L/C122S/G151H/Q175L/
 Q192E,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/
 Q192D,
 Q38F/I41S/D60bF/F60eR/Y60gF/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192V,
 Q38H/I41S/D60bY/D96Y/ins97aV/F97D/T98P/F99L/L106M/C122S/I136M/Q192G/Q209L/
 D217T,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96S/ins97aR/F97A/T98S/F99L/C122S/G151N/Q175L/
 Q192T,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/ins97aN/F97Y/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/
 Q192D,
 Q38H/I41A/D60bT/F60eH/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 ins97aY/F97G/T98V/C122S/Q175M/Q192S/D217V,
 Q38H/I41S/D60bS/ins97aV/F97D/T98P/F99L/M117L/C122S/I136T/Q192G/D217I,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96P/ins97aN/F97W/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/
 Q192D,
 Q38H/I41A/D60bT/F60eK/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192A,
 H40R/I41H/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192G/D217V/K224Y,
 I41G/F97I/F99L/C122S/G151L/Q175M/Q192S/D217V,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96V/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/
 Q192D,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/T150S/G151H/
 Q175L/ Q192D/Q209L,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eI/Y60gW/F97T/ins97aE/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96I/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,

Q38H/I41A/D60bW/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/I136M/Q192G/D217N,
 Q38H/I41S/D60bF/F60eT/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/H143Q/G151N/Q175L/Q192G,
 Q38Y/I41S/D60bT/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41A/F60eH/Y60gW/ins97aE/F97T/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192A,
 I41T/D60bW/F60eH/F97D/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192G,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96F/F97Y/ins97aD/T98G/F99L/C122S/G151H/Q175L/
 Q192D,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97S/ins97aH/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/
 Q192G,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192E,
 I41S/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192G/D217V,
 Q38R/I41S/D60bY/F60eD/ins97aV/F97D/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175M/Q192A,
 Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/T98G/F99L/C122S/G151N/Q175L/Q192D,
 H40R/I41H/Y60gH/F97D/F99L/C122S/Q175M/Q192G/D217I/K224L,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/F97D/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D,
 Q38Y/I41S/D60bT/F60eR/Y60gW/D96M/F97N/T98G/F99L/C122S/Q175L/Q192D,
 Q38H/I41A/D60bV/F60eR/Y60gW/D96F/F97Y/ins97aN/T98G/F99M/C122S/G151N/Q175L/
 Q192G,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96Y/F97N/ins97aE/T98S/F99L/C122S/G151H/Q175L/
 Q192D,
 Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97D/ins97aA/T98P/F99L/C122S/G151N/Q175L/
 Q192D и те же самые модификации за исключением того, что C122S не модифицирована
 и представляет собой C122C.

43. Модифицированный полипептид MTSP–1 по любому из пп. 1–42, содержащий модификации, соответствующие:

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/
 Q192D или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/G151H/Q175L/Q192D,
 где немодифицированный полипептид MTSP–1 содержит протеазный домен, указанный в
 SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

44. Модифицированный полипептид MTSP–1 по любому из пп. 1–42, содержащий модификации, соответствующие модификациям из I41D/C122S/G151N/Q192T или I41D/G151N/Q192T или I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T или I41E/F99L/G151N/Q192T, где немодифицированный полипептид MTSP–1 содержит протеазный домен, указанный в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4.

45. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1-4, где модифицированный полипептид MTSP-1 содержит последовательность аминокислотных остатков, указанную в любой из SEQ ID NO: 6, 8, 21-59 и 63-81 ,

46. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1-45, где модифицированный полипептид MTSP-1 содержит последовательность аминокислотных остатков, указанную в SEQ ID NO: 35.

47. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1-46, где немодифицированный полипептид MTSP-1 состоит из последовательности аминокислотных остатков, указанной в SEQ ID NO: 2 или 4 (протеазный домен).

48. Модифицированный полипептид MTSP-1 по п. 34, где немодифицированный полипептид MTSP-1 состоит из последовательности аминокислотных остатков, указанной в SEQ ID NO: 2 или 4.

49. Модифицированный полипептид MTSP-1 по п. 35, где немодифицированный полипептид MTSP-1 состоит из последовательности аминокислотных остатков, указанной в SEQ ID NO: 2 или 4.

50. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1-49, который расщепляет в остатках QHARASHL (остатки 737-744) человеческий C3 (SEQ ID NO:9).

51. Модифицированный полипептид MTSP-1 по п. 50, где P1-P1' представляет собой RA.

52. Модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1-51, который модифицирован полимером для увеличения периода полужизни в сыворотке и/или для снижения иммуногенности, или того и другого.

53. Модифицированный полипептид MTSP-1 по п. 52, который является ПЭГилированным.

54. Слитый белок, содержащий модифицированный полипептид MTSP-1 или каталитически активную часть модифицированного полипептида MTSP-1 по любому из пп. 1-53, который слит с полипептидом, не являющимся полипептидом MTSP-1-протеазы, или с его частью.

55. Слитый белок по п. 54, где непротеазный полипептид представляет собой домен мультимеризации или домен белковой трансдукции (PTD).

56. Слитый белок по п. 55, где непротеазный полипептид представляет собой домен мультимеризации, который представляет собой Fc домен.

57. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность аминокислотных остатков, кодирующую модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп.1-53 или слитый белок по любому из пп. 54-56.

58. Вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 57.
59. Вектор по п. 58, который является прокариотическим вектором.
60. Вектор по п. 58, который является эукариотическим вектором.
61. Вектор по п. 58, который представляет собой вирусный вектор.
62. Вектор по п. 58, который представляет собой дрожжевой вектор.
63. Вектор по любому из пп. 58, 60 и 61, который является вектором простого вируса герпеса, или вектором вируса коровьей оспы, или аденовирусным вектором, или ретровирусным вектором, или вектором насекомых.
64. Вектор по любому из пп. 58–63, который является вектором экспрессии.
65. Вектор по любому из пп. 58–64, который представляет собой вектор генной терапии.
66. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по п. 57 или вектора по любому из пп. 58–65 для генной терапии для лечения заболевания или состояния, связанного с активацией комплемента или вовлеченного в активацию комплемента, где ингибирование эффекта активации комплемента влияет на лечение или улучшение заболевания или состояния..
67. Способ лечения заболевания или состояния, опосредованного или включающего активацию комплемента, включающий введение субъекту вектора по любому из пп. 58–65 или введение молекулы нуклеиновой кислоты по п. 57 для лечения заболевания или состояния.
68. Способ по п. 67, в котором опосредованное комплементом заболевание или расстройство выбирают из числа воспалительных заболеваний и состояний, сепсиса, ревматоидного артрита (RA), глазного или офтальмологического заболевания или расстройства, сердечно–сосудистого заболевания, мембранопролиферативного гломерулонефрита (MPGN), рассеяного склероза (MS), миастении (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, острого воспалительного повреждения тканей, вызванного иммунным комплексом (IC), болезни Альцгеймера (AD), отторжения трансплантированного органа и синдрома ишемии–реперфузии.
69. Способ по п. 67 или 68, в котором заболевание или состояние представляет собой глазное или офтальмологическое заболевание или отторжение трансплантированного органа или воспаление, обусловленное трансплантированным органом.
70. Способ по п. 68, где заболевание или состояние представляет собой диабетическую ретинопатию или дегенерацию желтого пятна.

71. Способ по п. 70, где заболевание или состояние представляет собой дегенерацию желтого пятна.

72. Способ по п. 71, в котором дегенерация желтого пятна представляет собой возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD).

73. Способ по любому из пп. 67–69, где заболевание или состояние представляет собой отсроченную функцию трансплантата (DGF) почки.

74. Применение по п. 66, где опосредованное комплементом заболевание или расстройство, выбранно из сепсиса, ревматоидного артрита (RA), глазного заболевания, мембранопролиферативного гломерулонефрита (MPGN), рассеянного склероза (MS), миастении (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, острого воспалительного повреждения тканей, вызванного иммунным комплексом (IC), болезни Альцгеймера (AD) и синдрома ишемии-реперфузии.

75. Применение по п. 66 или 74, где заболевание или состояние представляет собой глазное или офтальмологическое заболевание или отторжение трансплантированного органа или воспаление, обусловленное трансплантированным органом.

76. Применение по п. 66, где заболевание или состояние представляет собой диабетическую ретинопатию или дегенерацию желтого пятна.

77. Применение по п. 76, где заболевание или состояние представляет собой дегенерацию желтого пятна.

78. Применение по п. 77, где дегенерация желтого пятна представляет собой возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD).

79. Применение по п. 74, где заболевание или состояние представляет собой отсроченную функцию трансплантата (DGF) почки.

80. Изолированная клетка или клеточная культура, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 57 или вектор по любому из пп. 58–65.

81. Изолированная клетка, не являющаяся человеческой, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 57 или вектора по любому из пп. 58–65.

82. Изолированная клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 57 или вектор по любому из пп. 58–65, где изолированная клетка не является зиготой человека.

83. Способ ингибирования активации комплемента, включающий контактирование модифицированного полипептида MTSP-1 по любому из пп. 1–53 или слитого белка по любому из пп. 54–56 с белком комплемента C3, в результате которого белок комплемента C3 расщепляется так, что активация комплемента уменьшается или ингибируется.

84. Способ по п. 83, в котором контактирование модифицированного полипептида MTSP-1 с белком комплемента C3 осуществляют *in vitro*.

85. Способ по п. 83, в котором контактирование модифицированного полипептида MTSP-1 с белком комплемента C3 осуществляют *in vivo*.

86. Способ по любому из пп. 83–85, в котором ингибирование активации комплемента приводит к уменьшению воспалительных симптомов, связанных с опосредованным комплементом заболеванием или расстройством, выбранным из воспалительного расстройства, нейродегенеративного расстройства и сердечно-сосудистого расстройства.

87. Способ по п. 86, в котором опосредованное комплементом заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из сепсиса, ревматоидного артрита (RA), глазных расстройств, мембранопролиферативного гломерулонефрита (MPGN), рассеянного склероза (MS), миастении (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, острого воспалительного повреждения тканей, вызванного иммунным комплексом (IC), болезни Альцгеймера (AD) и синдрома ишемии-реперфузии.

88. Способ по п. 87, в котором синдром ишемии-реперфузии вызван событием или лечением, выбранным из числа инфаркта миокарда (ИМ), инсульта, ангиопластики, шунтирования коронарной артерии, шунтирования легкого (ЦПБ) и гемодиализа.

89. Способ по любому из пп. 83–88, в котором опосредованное комплементом заболевание или расстройство возникает в результате лечения субъекта.

90. Способ по п. 89, где лечение модифицированным полипептидом MTSP-1 осуществляют до лечения субъекта, которое привело к опосредованному комплементом заболеванию или расстройству.

91. Способ лечения заболевания или состояния, опосредованного или включающего активацию комплемента, который включает введение модифицированного полипептида MTSP-1 по любому из пп. 1–53 или слитого белка по любому из пп. 54–56, в котором ингибирование активации комплемента влияет на лечение или улучшение заболевания или состояния.

92. Способ по п. 91, в котором опосредованное комплементом заболевание или расстройство выбрано из сепсиса, ревматоидного артрита (RA), глазного заболевания, мембранопролиферативного гломерулонефрита (MPGN), рассеянного склероза (MS), миастении (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, острого воспалительного повреждения тканей, связанного с иммунным комплексом (IC), болезни Альцгеймера (AD) и синдрома ишемии-реперфузии.

93. Способ по п. 91 или 92, в котором заболевание или состояние представляет собой заболевание глаз или отторжение или воспаление вследствие трансплантированного органа.

94. Способ по п. 93, где заболевание или состояние представляет собой диабетическую ретинопатию или дегенерацию желтого пятна.

95. Способ по п.94, где заболевание или состояние представляет собой дегенерацию желтого пятна.

96. Способ по п.95, в котором дегенерация желтого пятна представляет собой возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD).

97. Способ по п.93, где заболевание или состояние представляет собой отсроченную функцию трансплантата (DGF) почки.

98. Способ или применение по любому из пп. 66–79 и 83–97, где модифицированный полипептид MTSP–1 или слитый белок или кодирующая молекула нуклеиновой кислоты или вектор вводятся внутривенно.

99. Способ или применение по любому из пп. 66–79 и 83–97, где модифицированный полипептид MTSP–1 или слитый белок или кодирующую молекулу нуклеиновой кислоты или вектор вводят подкожно.

100. Способ или применение по любому из пп. 66–79 и 83–97, где модифицированный полипептид MTSP–1 или слитый белок или кодирующая молекула нуклеиновой кислоты или вектор вводятся в глаз.

101. Способ или применение по п. 100, где введение в глаз осуществляется посредством интравитреальной инъекции.

102. Способ или применение по п. 101, где модифицированный полипептид MTSP–1 связан с доменом трансдукции для облегчения трансдукции в стекловидное тело.

103. Способ или применение по любому из пп. 66–79 и 83–102, где модифицированный полипептид MTSP–1 является ПЭГилированным.

104. Комбинация, включающая:

(а) модифицированный полипептид MTSP–1 по любому из пп. 1–53 или слитый белок по любому из пп. 54–56; и

(б) второй агент или агенты для лечения опосредованного компонентом заболевания или расстройства.

105. Комбинация по п.104, в которой второй агент или агенты представляют собой противовоспалительный агент (ы) или антикоагулянт (ы).

106. Комбинация по п.105, где второй агент представляет собой противовоспалительный агент (ы), выбранный из любого одного или нескольких

нестероидных противовоспалительных препаратов (NSAID), антиметаболитов, кортикостероидов, анальгетиков, цитотоксических агентов, про-ингибиторов воспалительных цитокинов, противовоспалительных цитокинов, агентов, нацеленных на В-клетки, соединения, нацеленные на антигены Т блокаторы молекул адгезии, антагонистов хемокиновых рецепторов, ингибиторов киназы, лигандов PPAR- γ (гамма), ингибиторов комплемента, гепарина, варфарина, аценокумарола, фениндиона, ЭДТА цитрата, оксалата, аргатробана, лепирудина, бивалирудина и ксимелагатрана.

107. Способ, применение или комбинация по любому из пп. 66–79 и 83–106, где модифицированный полипептид MTSP–1 включает модификацию I41D или I41S.

108. Способ, применение или комбинация по любому из пп. 66–79 и 83–107, где модифицированный полипептид MTSP–1 включает модификацию I41S.

109. Способ, применение или комбинация по любому из пп. 66–79 и 83–108, где модифицированный полипептид MTSP–1 содержит модификации: Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D, или Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/G151H/Q175L/Q192D.

110. Способ, использование или комбинация по любому из пп. 66–79 и 83–107, где модифицированный полипептид MTSP–1 содержит модификации: I41D/C122S/G151N/Q192T или I41D/G151N/Q192T.

111. Способ, применение или комбинация по любому из пп. 66–79 и 83–110, где немодифицированный полипептид MTSP–1 содержит последовательность аминокислотных остатков, указанных в SEQ ID NO: 4.

112. Модифицированный полипептид MTSP–1 по любому из пп. 1–53 или слитый белок по любому из пп.54–56, или способ, применение или комбинация по любому из пп. 66–79 и 83–110, где модифицированный MTSP–1 полипептид содержит последовательность аминокислотных остатков, представленную в любой из SEQ ID NO: 35 и 42.

113. Способ лечения DGF, включающий внутривенное введение модифицированного полипептида MTSP–1 по любому из пп.1–53 или слитого белка по любому из пп.54–56.

114. Способ по п.113, где разовая дозировка составляет от 0,1 до 1 мг.

115. Способ по п.113 или 114, в котором модифицированный полипептид MTSP–1 содержит последовательность аминокислотных остатков, указанных в любой из SEQ ID NO: 35 и 42.

116. Способ по любому из пп. 113–115, в котором лечение повторяют множество раз.

117. Способ по любому из пп.113–116, в котором лечение повторяют каждые 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, еженедельно, раз в два месяца или ежемесячно.

118. Способ по любому из пп.113–117, в котором модифицированный полипептид MTSP–1 содержит замены
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/
Q192D.

119. Способ по любому из пп. 113–117, в котором модифицированный полипептид MTSP–1 содержит протеазный домен, указанный в SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 42, или его каталитически активную часть.

120. Способ лечения глазного расстройства или офтальмологического расстройства, включающий введение в глаз модифицированного полипептида MTSP–1 по любому из пп. 1–53.

121. Способ по п. 120, где расстройством является дегенерация желтого пятна или диабетическая ретинопатия.

122. Способ по п. 121, в котором расстройство представляет собой AMD.

123. Способ по п. 120, где разовая дозировка составляет от 0,1 до 1 мг.

124. Способ по любому из пп. 120–123, в котором модифицированный полипептид MTSP–1 содержит последовательность аминокислотных остатков, представленную в любой из SEQ ID NO: 35 и 42.

125. Способ по любому из пп.120–124, в котором лечение повторяют множество раз.

126. Способ по любому из пп.120–125, в котором лечение повторяют каждые 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, еженедельно, раз в два месяца или ежемесячно.

127. Способ по любому из пп. 120–126, в котором модифицированный полипептид MTSP–1 содержит замены
Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/
Q192D или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/G151H/Q175L/Q192D.

128. Способ по любому из пп. 111–117, в котором модифицированный полипептид MTSP–1 содержит замены I41D/C122S/G151N/Q192T или I41D/G151N/Q192T.

129. Способ по любому из пп.111–117, в котором модифицированный полипептид MTSP–1 содержит протеазный домен с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 35, или его каталитически активную часть.

130. Применение модифицированного полипептида MTSP-1 для лечения AMD или DGF, где модифицированный полипептид MTSP-1 содержит замены Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D или

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/G151H/Q175L/Q192D или I41D/C122S/G151N/Q192T или I41D/G151N/Q192T.

131. Применение модифицированного полипептида MTSP-1 по любому из пп. 1–53 или слитого белка по любому из пп. 54–56 для ингибирования активации комплемента.

132. Применение по п. 131, в котором:

модифицированный полипептид MTSP-1 контактирует с белком комплемента C3, в результате чего белок комплемента C3 расщепляется так, что активация комплемента уменьшается или ингибируется; и

контактирование модифицированного полипептида MTSP-1 с белком комплемента C3 осуществляется *in vitro* или у животного, не являющегося человеком.

133. Применение по п. 131, где контактирование модифицированного полипептида MTSP-1 с белком комплемента C3 осуществляют *in vivo*.

134. Применение по любому из пп. 131–133, где ингибирование активации комплемента приводит к уменьшению воспалительных симптомов, ассоциированных со связанными с комплементом опосредованным заболеванием или расстройством, выбранным из воспалительного расстройства, нейродегенеративного расстройства и сердечно-сосудистого расстройства.

135. Применение по п. 134, в котором связанное с комплементом заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из сепсиса, ревматоидного артрита (RA), глазных расстройств, мембранопролиферативного гломерулонефрита (MPGN), рассеянного склероза (MS), миастении (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, иммунного комплекса (IC) опосредованное острым воспалительным повреждением тканей, болезнью Альцгеймера (AD) и синдрома ишемии–реперфузии.

136. Применение по п. 135, в котором синдром ишемии–реперфузии вызван с заболеванием или лечением заболевания, выбранного из группы, состоящей из инфаркта миокарда, инсульта, ангиопластики, шунтирования коронарной артерии, шунтирования сердца (ЦПБ) и гемодиализа.

137. Применение по любому из пп. 131–136, где заболевание или расстройство, опосредованное комплементом, является результатом лечения субъекта.

138. Применение по любому из пп. 131–137, в котором лечение модифицированным полипептидом MTSP-1 осуществляют до лечения субъекта.

139. Применение модифицированного полипептида MTSP-1 по любому из пп. 1–53 или слитого белка по любому из пп. 54–56 для лечения заболевания или состояния, связанного с активацией комплемента или включающего активацию комплемента, где ингибирование активации комплемента влияет на лечение или улучшение заболевания или состояния.

140. Применение по п. 139, в котором связанное с комплементом заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита (RA), заболевания глаз, мембранопролиферативного гломерулонефрита (MPGN), рассеянного склероза (MS), миастении (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, острого воспалительного повреждения тканей, вызванного иммунным комплексом (ИК/IC), болезни Альцгеймера (AD) и синдрома ишемии–гиперфузии.

141. Применение по п. 140, где заболевание или состояние представляет собой заболевание глаз или представляет собой отторжение или воспаление вследствие трансплантированного органа.

142. Применение по п. 141, где заболевание или состояние представляет собой диабетическую ретинопатию или макулярную дегенерацию.

143. Применение по п. 142, где заболевание или состояние представляет собой макулярную дегенерацию.

144. Применение по п. 143, в котором макулярная дегенерация представляет собой возрастную макулярную дегенерацию (AMD).

145. Применение по п. 141, в котором, заболевание или состояние представляет собой отсроченную функцию трансплантата (DGF) почки.

146. Применение по любому из пп. 131–145, где модифицированный полипептид MTSP-1 содержит модификации:

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D или I41E/F99L/C122S/G151N/Q192T.

147. Применение по п. 145, где модифицированный полипептид MTSP-1 содержит модификации:

Q38H/I41S/D60bT/F60eS/Y60gW/D96K/F97G/ins97aV/T98P/F99L/C122S/G151H/Q175L/Q192D.

148. Применение по п. 145, где модифицированный полипептид MTSP-1 содержит модификации: I41D/C122S/G151N/Q192T.

149. Способ получения модифицированного полипептида MTSP-1, включающий: введение в клетку нуклеиновой кислоты или вектора, кодирующего модифицированный полипептид MTSP-1 по любому из пп. 1–53 или слитый белок по любому из пп. 54–56;

культивирование клетки в условиях, при которых полипептид экспрессируется; и, необязательно, выделение экспрессированного полипептида.

150. Способ по п. 149, где клетка представляет собой эукариотическую клетку.

151. Способ по п. 150, где клетка представляет собой клетку млекопитающего или клетку дрожжей.

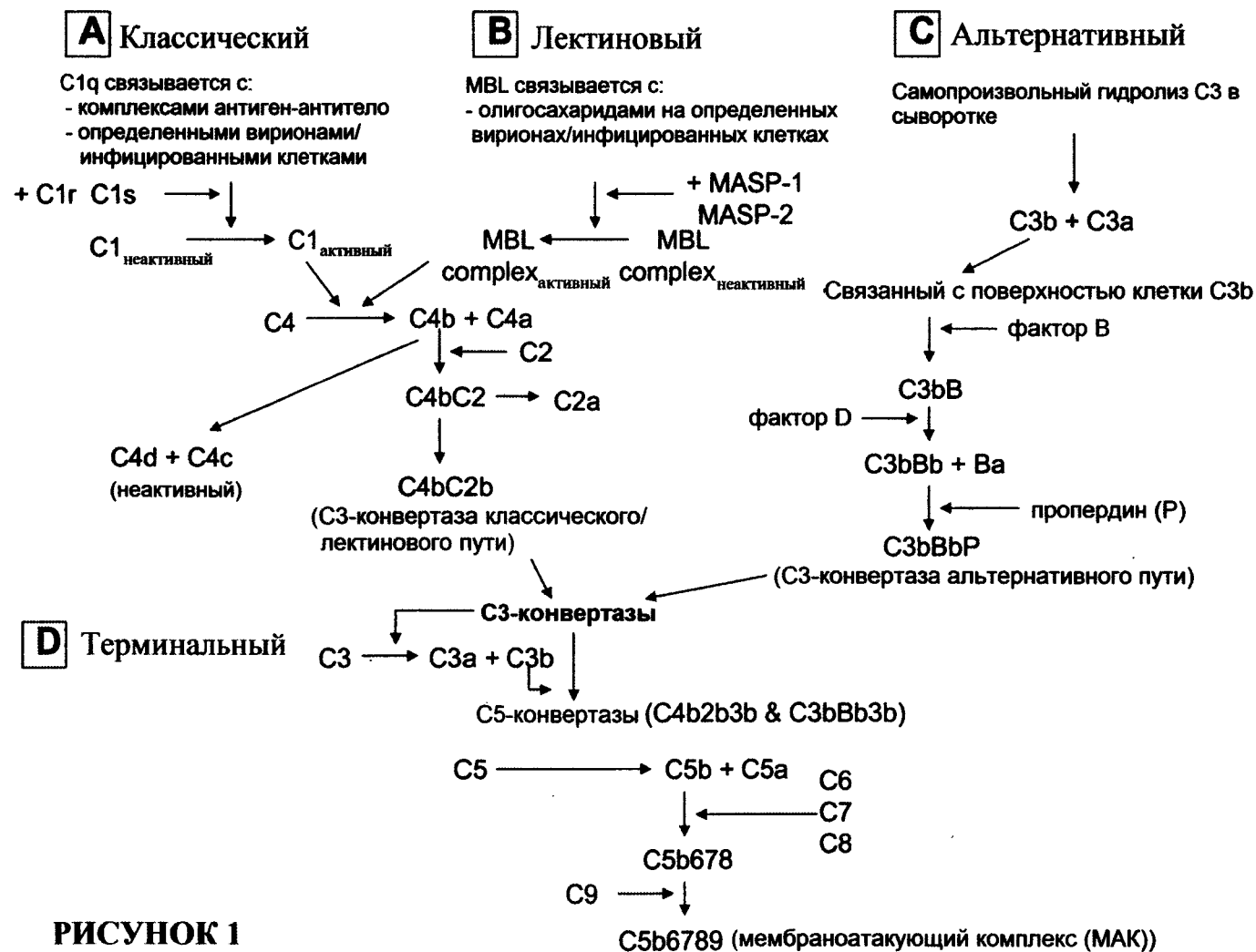


РИСУНОК 1