

R U  
2 5 7 0 6 3 9 C 2



(19) RU (11) 2 570 639<sup>(13)</sup> C2

(51) МПК  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C07K 16/46* (2006.01)  
*C07K 19/00* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*G01N 33/532* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012112067/10, 27.08.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
27.08.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
29.08.2009 US 61/238,152;  
16.11.2009 US 61/261,728

(43) Дата публикации заявки: 10.10.2013 Бюл. № 28

(45) Опубликовано: 10.12.2015 Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2008/139202 A1, 20.11.2008. WO 2008/042236 A2, 10.04.2008. WO 2008/060705 A2, 22.05.2008. US 2008/181899 A1, 31.07.2008.  
RIDGWAY J. et al., "Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis." Nature (2006); 444: 1083-1087.  
THURSTON G. et al., "The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 29.03.2012

(86) Заявка РСТ:  
US 2010/047006 (27.08.2010)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2011/025964 (03.03.2011)

Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

БЕНАТУИЛ Лоренцо (US),  
БОГХАРТ Эрвин Р. (US),  
ГУ Цзицзе (US),  
ХАРРИС Мария (US),  
ХИКСОН Джонатан А. (US),  
ХСИЕХ Чунг-Минг (US),  
КУЦКОВА Юлия (US),  
ЛИ Инчунь (US),  
ЛЮ Чжихун (US),  
МОРГАН-ЛЭПП Сьюзан (US)

(73) Патентообладатель(и):  
ЭББВИ ИНК (US)

## (54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ DLL4-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области иммунологии. Предложено антитело и его антигенсвязывающий фрагмент, способные связываться с дельта-подобным лигандом 4 (DLL4) человека, в том числе в форме меченого антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента, конструкции с константным доменом иммуноглобулина, конъюгата с терапевтическим или цитотоксическим средством и в кристаллизованной форме. Кроме того, рассмотрены: изолированная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его фрагмент

R U  
2 5 7 0 6 3 9 C 2

R U 2 5 7 0 6 3 9 C 2

R U 2 5 7 0 6 3 9 C 2

по изобретению, вектор экспрессии, клетка-хозяин и способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; а также фармацевтическая композиция для модуляции заболевания или расстройства, способы снижения активности человеческого DLL4 и способ лечения пациента, страдающего расстройством, ассоциированным с негативным воздействием

DLL4. Антитело по настоящему изобретению и его антигенсвязывающий фрагмент обладают способностью блокировать передачу сигнала Notch1, что может найти дальнейшее применение в терапии заболеваний, опосредованных повышенной активностью сигнального пути Notch1. 14 н. и 35 з.п. ф-лы, 31 табл., 11 пр.

(56) (продолжение):

"tumour growth." Nature Reviews Cancer (2007); 7: 327-331. RU 2197262 C2, 27.01.2003.

R U  
2 5 7 0 6 3 9  
C 2



(19) RU (11) 2 570 639<sup>(13)</sup> C2

(51) Int. Cl.  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C07K 16/46* (2006.01)  
*C07K 19/00* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*G01N 33/532* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2012112067/10, 27.08.2010

(24) Effective date for property rights:  
27.08.2010

Priority:

(30) Convention priority:  
29.08.2009 US 61/238,152;  
16.11.2009 US 61/261,728

(43) Application published: 10.10.2013 Bull. № 28

(45) Date of publication: 10.12.2015 Bull. № 34

(85) Commencement of national phase: 29.03.2012

(86) PCT application:  
US 2010/047006 (27.08.2010)

(87) PCT publication:  
WO 2011/025964 (03.03.2011)

Mail address:  
129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,  
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

BENATUIL Lorentso (US),  
BOGKhART Ehrvin R. (US),  
GU Tszitsze (US),  
KhARRIS Marija (US),  
KhIKSON Dzhonatan A. (US),  
KhSIEKH Chung-Ming (US),  
KUTsKOVA Julija (US),  
LI Inchun' (US),  
LJu Chzhikhun (US),  
MORGAN-LEhPP S'juzan (US)

(73) Proprietor(s):

EhBBVI INK (US)

R U  
2 5 7 0 6 3 9  
C 2

## (54) THERAPEUTIC DLL4-BINDING PROTEINS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: present invention refers to immunology. Presented are an antibody and its antigen-binding fragment able to bind to human delta-like ligands 4 (DLL4), including in the form of a labelled antibody or its antigen-binding fragment, a structure with a constant domain of immunoglobulin, a conjugate with a therapeutic or cytotoxic agent and in the crystallised form. Besides, disclosed are: an isolated nucleic acid coding the antibody or its fragment according to the invention, an expression vector, a host cell and a method for producing the antibody or its

antigen-binding fragment; as well as a pharmaceutical composition for modulating a disease or a disorder, a method for reducing human DLL4 activity and a method of treating a patient suffering a disorder associated with the negative effect of DLL4.

EFFECT: antibody according to the present invention or its antigen-binding fragment have an ability to block Notch1 signalling that can find further application in a therapy of the diseases mediated by Notch1 signal pathway overactivity.

49 cl, 31 tbl, 11 ex

**Ссылка на родственные заявки**

В настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США № 61/238152, поданной 29 августа 2009 г., и предварительной заявки на патент США № 61/261728, поданной 16 ноября 2009 г.

5 **Область, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к получению и применению DLL4-связывающих белков с улучшенными свойствами, и к их использованию для подавления, предупреждения и/или лечения раковых заболеваний, опухолей и/или других ассоциированных с ангиогенезом заболеваний, таких как глазная неоваскуляризация, 10 или заболеваний, не ассоциированных с ангиогенезом и характеризующихся нарушением экспрессии или активности DLL4, таких как аутоиммунные расстройства.

**Предшествующий уровень техники**

Межклеточные взаимодействия необходимы для осуществления множества биологических процессов, таких как дифференцировка, пролиферация и гомеостаз.

15 Одной из систем, используемых эукариотами широкого ряда, является путь передачи сигнала Notch. Этот путь, а в частности, рецептор Notch, также играет важную роль в функциональном ангиогенезе опухоли. Таким образом, ингибирование функции рецептора Notch, блокирование рецептора Notch и/или блокирование пути передачи Notch-сигнала является стратегией, которая может быть применена для получения 20 противораковых композиций и разработки методов лечения рака. Было установлено, что небольшие молекулы-ингибиторы рецептора Notch являются токсичными, поскольку они подавляют экспрессию рецептора Notch в тканях дикого типа (нормальных тканях) во всем организме. Таким образом, различные члены пути передачи сигнала Notch должны рассматриваться как потенциальные мишени для терапии.

25 Лигандом сосудистой сети для рецептора Notch является дельта 4 или дельта-подобный лиганд 4 (DLL4). DLL4, который экспрессируется, главным образом, в сосудистой сети, играет важную роль в развитии сосудов (Yan et al., *Clin. Cancer Res.*, 13(24): 7243-7246 (2007); Shutter et al., *Genes Dev.*, 14(11): 1313-1318 (2000); Gale et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(45): 15949-15954 (2004); Krebs et al., *Genes Dev.*, 14(11): 1343-1352 (2000)). Мыши, гетерозиготные по DLL4, погибают на стадии эмбрионального развития, что обусловлено значительными нарушениями развития сосудов (Gale et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(45): 15949-15954 (2004); Duarte et al., *Genes Dev.*, 18(20): 2474-2478 (2004); Krebs et al., *Genes Dev.*, 18(20): 2469-2473 (2004)). Экспрессия DLL4 может быть индуцирована VEGF (Liu et al., *Mol. Cell Biol.*, 23(1): 14-25 (2003); Lobov et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(9): 3219-3224 (2007)). В свою очередь, DLL4 может снижать передачу сигнала VEGF, частично посредством ингибирования VEGFR2 и индуцирования VEGRI (Harrington et al., *Microvasc. Res.*, 75(2): 144-154 (2008); Suchting et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(9): 3225-3230 (2007)). Тонкая координация между DLL4 и VEGF играет важную роль в функциональном ангиогенезе.

40 Помимо своей физиологической роли DLL4 также активируется в кровеносных сосудах опухолей (Gale et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(45): 15949-15954 (2004); Mailhos et al., *Differentiation*, 69(2-3): 135-144 (2001); Patel et al., *Cancer Res.*, 65(19): 8690-8697 (2005); Patel et al., *Clin. Cancer Res.*, 12(16): 4836-4844 (2006); Noguera-Troise et al., *Nature*, 444(7122): 1032-1037 (2006)). Блокирование DLL4 приводит к сильному 45 ингибированию роста первичной опухоли во многих моделях (Noguera-Troise et al., *Nature*, 444(7122): 1032-1037 (2006); Ridgway et al., *Nature*, 444(7122): 1083-1087 (2006); Scehnet et al., *Blood*, 109(11): 4753-4760 (2007)). Такое ингибирование DLL4 является эффективным даже по отношению к опухолям, резистентным к терапии анти-VEGF

антителами. Комбинированное ингибирирование DLL4 и VEGF приводит к повышению противоопухолевой активности. Интересно отметить, что в отличие от ингибирирования VEGF, которое снижает образование опухолевых сосудов, блокирование DLL4 приводит к повышению плотности сосудистой сети опухоли, где указанные сосуды являются

5 аномальными, не могут обеспечивать эффективное прохождение кровотока и являются функционально неэффективными. Таким образом, DLL4 является потенциальной мишенью для лечения рака.

Поэтому необходимо получить такие терапевтические средства, которые могут быть нацелены на путь DLL4-Notch и тем самым ингибирировать этот путь или даже 10 предотвращать ангиогенез и рост опухоли.

#### **Описание сущности изобретения**

Настоящее изобретение относится к белкам, которые связываются с DLL4, включая антитела, CDR-привитые антитела и их связывающие фрагменты, обладающие способностью связываться с DLL4. Описанный здесь связывающий белок,

15 предпочтительно, связывается с DLL4 с высокой аффинностью. Более предпочтительно, связывающий белок согласно изобретению обладает способностью нейтрализовать DLL4. Настоящее изобретение также относится к способам получения и применения DLL4-связывающих белков, включая человеческие DLL4-связывающие белки.

Преимущество настоящего изобретения заключается в том, что оно не требует 20 получения гуманизированных DLL4-связывающих белков, что позволяет избежать проблем, возникающих при использовании гуманизированных DLL4-связывающих белков.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к связывающему белку, содержащему антигенсвязывающий домен, способный связываться с человеческим 25 DLL4, где указанный антигенсвязывающий домен включает по меньшей мере одну или несколько CDR, выбранных из группы, состоящей из:

CDR-H1: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 99), где:

X<sub>1</sub> представляет собой S или N;

30 X<sub>2</sub> представляет собой S, G или N;

X<sub>3</sub> представляет собой S, N, T, G или R;

X<sub>4</sub> представляет собой Y;

X<sub>5</sub> представляет собой Y или H;

35 X<sub>6</sub> представляет собой W; и

X<sub>7</sub> представляет собой G;

CDR-H2: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub> (SEQ ID NO: 100),

где:

X<sub>1</sub> представляет собой D;

40 X<sub>2</sub> представляет собой I;

X<sub>3</sub> представляет собой Y, N или S;

X<sub>4</sub> представляет собой Y;

X<sub>5</sub> представляет собой T, N, A, I, S или R;

45 X<sub>6</sub> представляет собой G;

X<sub>7</sub> представляет собой S, N, T или G;

X<sub>8</sub> представляет собой T;

X<sub>9</sub> представляет собой Y;  
 X<sub>10</sub> представляет собой Y;  
 X<sub>11</sub> представляет собой N;  
 5 X<sub>12</sub> представляет собой P;  
 X<sub>13</sub> представляет собой S;  
 X<sub>14</sub> представляет собой L;  
 X<sub>15</sub> представляет собой K; и  
 10 X<sub>16</sub> представляет собой S, N, D или G;  
 CDR-H3: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub> (SEQ ID NO: 101), где:  
 X<sub>1</sub> представляет собой E, Y, F, Q, W, L или A;  
 X<sub>2</sub> представляет собой D, A, S, G, V, E или N;  
 15 X<sub>3</sub> представляет собой V, M, L, P или A;  
 X<sub>4</sub> представляет собой I, A, P, R, S, K, Q, V, G, M или E;  
 X<sub>5</sub> представляет собой L, Y, F или M;  
 X<sub>6</sub> представляет собой R, G, S, Q или A;  
 20 X<sub>7</sub> представляет собой G;  
 X<sub>8</sub> представляет собой G, A или S;  
 X<sub>9</sub> представляет собой S, A, L, V, R или G;  
 X<sub>10</sub> представляет собой D; и  
 X<sub>11</sub> представляет собой Y, D, S, N, H, E, R, L, P, C, I, M, T, Q или K;  
 25 CDR-L1: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub> (SEQ ID NO: 102), где:  
 X<sub>1</sub> представляет собой S;  
 X<sub>2</sub> представляет собой G;  
 X<sub>3</sub> представляет собой Q, E или D;  
 30 X<sub>4</sub> представляет собой R, S, G, M, K, L или T;  
 X<sub>5</sub> представляет собой L;  
 X<sub>6</sub> представляет собой G;  
 X<sub>7</sub> представляет собой D или E;  
 X<sub>8</sub> представляет собой K;  
 35 X<sub>9</sub> представляет собой Y;  
 X<sub>10</sub> представляет собой A или V; и  
 X<sub>11</sub> представляет собой S;  
 40 CDR-L2: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 103), где:  
 X<sub>1</sub> представляет собой E или Q;  
 X<sub>2</sub> представляет собой D;  
 X<sub>3</sub> представляет собой S, L, T, A, E или F;  
 45 X<sub>4</sub> представляет собой K, T, E, N, Q, S или M;  
 X<sub>5</sub> представляет собой R;  
 X<sub>6</sub> представляет собой P; и

X<sub>7</sub> представляет собой S;

и

CDR-L3: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub> (SEQ ID NO: 104), где:

<sup>5</sup> X<sub>1</sub> представляет собой Q;

X<sub>2</sub> представляет собой A;

X<sub>3</sub> представляет собой W;

X<sub>4</sub> представляет собой D;

<sup>10</sup> X<sub>5</sub> представляет собой R, S, M, E, N, G или K;

X<sub>6</sub> представляет собой D или E;

X<sub>7</sub> представляет собой T, V, A, S или M;

X<sub>8</sub> представляет собой G, A или C; и

X<sub>9</sub> представляет собой V.

<sup>15</sup> Предпочтительно, антигенсвязывающий домен DLL4-связывающего белка согласно изобретению содержит по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

остатков 31-37 SEQ ID NO: 1 (CDR-H1); остатков 52-67 SEQ ID NO: 1 (CDR-H2);

остатков 100-110 SEQ ID NO: 1 (CDR-H3);

<sup>20</sup> остатков 23-33 SEQ ID NO: 111 (CDR-L1); остатков 49-55 SEQ ID NO: 111 (CDR-L2); остатков 88-96 SEQ ID NO: 111 (CDR-L3);

SEQ ID NO: 117 (CDR-H1); SEQ ID NO: 118 (CDR-H2); SEQ ID NO: 119 (CDR-H3); SEQ ID NO: 121 (CDR-H1); SEQ ID NO: 122 (CDR-H2); SEQ ID NO: 123 (CDR-H3); SEQ ID NO:

<sup>25</sup> 125 (CDR-H1); SEQ ID NO: 126 (CDR-H2); SEQ ID NO: 127 (CDR-H3); SEQ ID NO: 129 (CDR-H1); SEQ ID NO: 130 (CDR-H2); SEQ ID NO: 131 (CDR-H3); SEQ ID NO: 133 (CDR-H1); SEQ ID NO: 134 (CDR-H2); SEQ ID NO: 135 (CDR-H3); SEQ ID NO: 137 (CDR-H1);

SEQ ID NO: 138 (CDR-H2); SEQ ID NO: 139 (CDR-H3); SEQ ID NO: 141 (CDR-H1); SEQ ID NO: 142 (CDR-H2); SEQ ID NO: 143 (CDR-H3); SEQ ID NO: 145 (CDR-H1); SEQ ID NO:

<sup>30</sup> 146 (CDR-H2); SEQ ID NO: 147 (CDR-H3); SEQ ID NO: 149 (CDR-H1); SEQ ID NO: 150 (CDR-H2); SEQ ID NO: 151 (CDR-H3); SEQ ID NO: 153 (CDR-H1); SEQ ID NO: 154 (CDR-H2); SEQ ID NO: 155 (CDR-H3); SEQ ID NO: 157 (CDR-H1); SEQ ID NO: 158 (CDR-H2);

SEQ ID NO: 159 (CDR-H3); SEQ ID NO: 161 (CDR-H1); SEQ ID NO: 162 (CDR-H2); SEQ ID NO: 163 (CDR-H3); SEQ ID NO: 165 (CDR-H1); SEQ ID NO: 166 (CDR-H2); SEQ ID NO:

<sup>35</sup> 167 (CDR-H3); SEQ ID NO: 169 (CDR-H1); SEQ ID NO: 170 (CDR-H2); SEQ ID NO: 171 (CDR-H3); SEQ ID NO: 173 (CDR-H1); SEQ ID NO: 174 (CDR-H2); SEQ ID NO: 175 (CDR-H3); SEQ ID NO: 177 (CDR-H1); SEQ ID NO: 178 (CDR-H2); SEQ ID NO: 179 (CDR-H3);

SEQ ID NO: 181 (CDR-H1); SEQ ID NO: 182 (CDR-H2); SEQ ID NO: 183 (CDR-H3); SEQ ID NO: 185 (CDR-H1); SEQ ID NO: 186 (CDR-H2); SEQ ID NO: 187 (CDR-H3); SEQ ID NO:

<sup>40</sup> 189 (CDR-H1); SEQ ID NO: 190 (CDR-H2); SEQ ID NO: 191 (CDR-H3); SEQ ID NO: 193 (CDR-H1); SEQ ID NO: 194 (CDR-H2); SEQ ID NO: 195 (CDR-H3); SEQ ID NO: 197 (CDR-H1); SEQ ID NO: 198 (CDR-H2); SEQ ID NO: 199 (CDR-H3); SEQ ID NO: 201 (CDR-H1);

SEQ ID NO: 202 (CDR-H2); SEQ ID NO: 203 (CDR-H3); SEQ ID NO: 205 (CDR-H1); SEQ ID NO: 206 (CDR-H2); SEQ ID NO: 207 (CDR-H3); SEQ ID NO: 209 (CDR-H1); SEQ ID NO:

<sup>45</sup> 210 (CDR-H2); SEQ ID NO: 211 (CDR-H3); SEQ ID NO: 213 (CDR-H1); SEQ ID NO: 214 (CDR-H2); SEQ ID NO: 215 (CDR-H3); SEQ ID NO: 217 (CDR-L1); SEQ ID NO: 218 (CDR-L2); SEQ ID NO: 219 (CDR-L3); SEQ ID NO: 221 (CDR-L1); SEQ ID NO: 222 (CDR-L2); SEQ ID NO: 223 (CDR-L3); SEQ ID NO: 225 (CDR-L1); SEQ ID NO: 226 (CDR-L2); SEQ ID NO:

227 (CDR-L3); SEQ ID NO: 229 (CDR-L1); SEQ ID NO: 230 (CDR-L2); SEQ ID NO: 231

(CDR-L3); SEQ ID NO: 233 (CDR-L1); SEQ ID NO: 234 (CDR-L2); SEQ ID NO: 235 (CDR-L3); SEQ ID NO: 237 (CDR-L1); SEQ ID NO: 238 (CDR-L2); SEQ ID NO: 239 (CDR-L3); SEQ ID NO: 241 (CDR-L1); SEQ ID NO: 242 (CDR-L2); SEQ ID NO: 243 (CDR-L3); SEQ ID NO: 245 (CDR-L1); SEQ ID NO: 246 (CDR-L2); SEQ ID NO: 247 (CDR-L3); SEQ ID NO: 249  
5 (CDR-L1); SEQ ID NO: 250 (CDR-L2); SEQ ID NO: 251 (CDR-L3); SEQ ID NO: 253 (CDR-L1); SEQ ID NO: 254 (CDR-L2); SEQ ID NO: 255 (CDR-L3); SEQ ID NO: 257 (CDR-L1); SEQ ID NO: 258 (CDR-L2); SEQ ID NO: 259 (CDR-L3); SEQ ID NO: 261 (CDR-L1); SEQ ID NO: 262 (CDR-L2); SEQ ID NO: 263 (CDR-L3); SEQ ID NO: 265 (CDR-L1); SEQ ID NO: 266 (CDR-L2); SEQ ID NO: 267 (CDR-L3); SEQ ID NO: 269 (CDR-L1); SEQ ID NO: 270 (CDR-L2);  
10 SEQ ID NO: 271 (CDR-L3); SEQ ID NO: 273 (CDR-L1); SEQ ID NO: 274 (CDR-L2); SEQ ID NO: 275 (CDR-L3); SEQ ID NO: 277 (CDR-L1); SEQ ID NO: 278 (CDR-L2); SEQ ID NO: 279 (CDR-L3); SEQ ID NO: 281 (CDR-L1); SEQ ID NO: 282 (CDR-L2); SEQ ID NO: 283 (CDR-L3); SEQ ID NO: 285 (CDR-L1); SEQ ID NO: 286 (CDR-L2); SEQ ID NO: 287 (CDR-L3); SEQ ID NO: 289 (CDR-L1); SEQ ID NO: 290 (CDR-L2); SEQ ID NO: 291 (CDR-L3); SEQ  
15 ID NO: 293 (CDR-L1); SEQ ID NO: 294 (CDR-L2); SEQ ID NO: 295 (CDR-L3); SEQ ID NO: 297 (CDR-L1); SEQ ID NO: 298 (CDR-L2); SEQ ID NO: 299 (CDR-L3); SEQ ID NO: 301 (CDR-L1); SEQ ID NO: 302 (CDR-L2); SEQ ID NO: 303 (CDR-L3); SEQ ID NO: 305 (CDR-L1); SEQ ID NO: 306 (CDR-L2); SEQ ID NO: 307 (CDR-L3); SEQ ID NO: 309 (CDR-L1); SEQ ID NO: 310 (CDR-L2); SEQ ID NO: 311 (CDR-L3); SEQ ID NO: 313 (CDR-L1); SEQ ID NO:  
20 314 (CDR-L2); SEQ ID NO: 315 (CDR-L3);  
 остатков 31-37 SEQ ID NO: 334 (CDR-H1); остатков 52-67 SEQ ID NO: 334 (CDR-H2);  
 остатков 100-110 SEQ ID NO: 334 (CDR-H3);  
 остатков 23-33 SEQ ID NO: 335 (CDR-L1); остатков 49-55 SEQ ID NO: 335 (CDR-L2);  
 остатков 88-96 SEQ ID NO: 335 (CDR-L3);  
25 остатков 31-37 SEQ ID NO: 336 (CDR-H1); остатков 52-67 SEQ ID NO: 336 (CDR-H2);  
 остатков 100-110 SEQ ID NO: 336 (CDR-H3);  
 остатков 23-33 SEQ ID NO: 337 (CDR-L1); остатков 49-55 SEQ ID NO: 337 (CDR-L2);  
 остатков 88-96 SEQ ID NO: 337 (CDR-L3);  
 остатков 31-37 SEQ ID NO: 338 (CDR-H1); остатков 52-67 SEQ ID NO: 338 (CDR-H2);  
30 остатков 100-110 SEQ ID NO: 338 (CDR-H3);  
 остатков 23-33 SEQ ID NO: 339 (CDR-L1); остатков 49-55 SEQ ID NO: 339 (CDR-L2);  
 остатков 88-96 SEQ ID NO: 339 (CDR-L3);  
 остатков 31-37 SEQ ID NO: 340 (CDR-H1); остатков 52-67 SEQ ID NO: 340 (CDR-H2);  
 остатков 100-110 SEQ ID NO: 340 (CDR-H3);  
35 остатков 23-33 SEQ ID NO: 341 (CDR-L1); остатков 49-55 SEQ ID NO: 341 (CDR-L2);  
 остатков 88-96 SEQ ID NO: 341 (CDR-L3);  
 остатков 31-37 SEQ ID NO: 342 (CDR-H1); остатков 52-67 SEQ ID NO: 342 (CDR-H2);  
 остатков 100-110 SEQ ID NO: 342 (CDR-H3);  
 остатков 23-33 SEQ ID NO: 343 (CDR-L1); остатков 49-55 SEQ ID NO: 343 (CDR-L2);  
40 остатков 88-96 SEQ ID NO: 343 (CDR-L3);  
 остатков 31-37 SEQ ID NO: 344 (CDR-H1); остатков 52-67 SEQ ID NO: 344 (CDR-H2);  
 остатков 100-110 SEQ ID NO: 344 (CDR-H3);  
 остатков 24-34 SEQ ID NO: 345 (CDR-L1); остатков 50-56 SEQ ID NO: 345 (CDR-L2);  
 остатков 89-97 SEQ ID NO: 345 (CDR-L3);  
45 остатков 31-37 SEQ ID NO: 346 (CDR-H1); остатков 52-67 SEQ ID NO: 346 (CDR-H2);  
 остатков 100-110 SEQ ID NO: 346 (CDR-H3);  
 остатков 23-33 SEQ ID NO: 347 (CDR-L1); остатков 49-55 SEQ ID NO: 347 (CDR-L2);  
 остатков 88-96 SEQ ID NO: 347 (CDR-L3);

остатков 31-37 SEQ ID NO: 348 (CDR-H1); остатков 52-67 SEQ ID NO: 348 (CDR-H2);  
 остатков 100-110 SEQ ID NO: 348 (CDR-H3);  
 остатков 24-34 SEQ ID NO: 349 (CDR-L1); остатков 50-56 SEQ ID NO: 349 (CDR-L2);  
 остатков 89-97 SEQ ID NO: 349 (CDR-L3);  
<sup>5</sup>      остатков 31-37 SEQ ID NO: 350 (CDR-H1); остатков 52-67 SEQ ID NO: 350 (CDR-H2);  
 остатков 100-110 SEQ ID NO: 350 (CDR-H3);  
 остатков 24-34 SEQ ID NO: 351 (CDR-L1); остатков 50-56 SEQ ID NO: 351 (CDR-L2);  
 остатков 89-97 SEQ ID NO: 351 (CDR-L3);  
 остатков 31-37 SEQ ID NO: 352 (CDR-H1); остатков 52-67 SEQ ID NO: 352 (CDR-H2);  
<sup>10</sup>     остатков 100-110 SEQ ID NO: 352 (CDR-H3);  
 остатков 24-34 SEQ ID NO: 353 (CDR-L1); остатков 50-56 SEQ ID NO: 353 (CDR-L2);  
 остатков 89-97 SEQ ID NO: 353 (CDR-L3);  
 остатков 31-37 SEQ ID NO: 354 (CDR-H1); остатков 52-67 SEQ ID NO: 354 (CDR-H2);  
 остатков 100-110 SEQ ID NO: 354 (CDR-H3);  
<sup>15</sup>     остатков 24-34 SEQ ID NO: 355 (CDR-L1); остатков 50-56 SEQ ID NO: 355 (CDR-L2);  
 остатков 89-97 SEQ ID NO: 355 (CDR-L3);  
 остатков 31-37 SEQ ID NO: 356 (CDR-H1); остатков 52-67 SEQ ID NO: 356 (CDR-H2);  
 остатков 100-110 SEQ ID NO: 356 (CDR-H3);  
 остатков 23-33 SEQ ID NO: 357 (CDR-L1); остатков 49-55 SEQ ID NO: 357 (CDR-L2);  
<sup>20</sup>     остатков 88-96 SEQ ID NO: 357 (CDR-L3);  
 остатков 31-37 SEQ ID NO: 358 (CDR-H1); остатков 52-67 SEQ ID NO: 358 (CDR-H2);  
 остатков 100-110 SEQ ID NO: 358 (CDR-H3);  
 остатков 23-33 SEQ ID NO: 359 (CDR-L1); остатков 49-55 SEQ ID NO: 359 (CDR-L2);  
 остатков 88-96 SEQ ID NO: 359 (CDR-L3);  
<sup>25</sup>     остатков 31-37 SEQ ID NO: 360 (CDR-H1); остатков 52-67 SEQ ID NO: 360 (CDR-H2);  
 остатков 100-110 SEQ ID NO: 360 (CDR-H3);  
 остатков 23-33 SEQ ID NO: 361 (CDR-L1); остатков 49-55 SEQ ID NO: 361 (CDR-L2);  
 остатков 88-96 SEQ ID NO: 361 (CDR-L3).

В другом варианте изобретения связывающий белок содержит по меньшей мере 3

<sup>30</sup> CDR, описанные выше.

Предпочтительно, DLL4-связывающий белок согласно изобретению содержит одну или несколько описанных выше CDR. Более предпочтительно, указанный связывающий белок содержит три или более CDR, описанных выше. Наиболее предпочтительно, DLL4-связывающий белок согласно изобретению содержит шесть CDR, описанных выше, то есть CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, описанные выше.

В предпочтительном варианте изобретения связывающий белок содержит по меньшей мере 3 CDR, выбранных из группы, состоящей из описанных выше последовательностей.

Более предпочтительно, связывающий белок содержит 3 CDR, выбранных из набора CDR вариабельного домена, выбранного из нижеследующей группы:

Набор VH E9 CDR

CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 1

CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 1

CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 1

Набор VL E9 CDR

CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 111

CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 111

CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 111

Набор VH E9.4 CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 117  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 118  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 119  
Набор VL E9.4 CDR  
<sup>5</sup> CDR-L1: SEQ ID NO: 229  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 230  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 231  
Набор VH E9.11 CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 121  
<sup>10</sup> CDR-H2: SEQ ID NO: 122  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 123  
Набор VL E9.11 CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 233  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 234  
<sup>15</sup> CDR-L3: SEQ ID NO: 235  
Набор VH E9.14 CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 125  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 126  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 127  
<sup>20</sup> Набор VL E9.14 CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 237  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 238  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 239  
Набор VH E9.17 CDR  
<sup>25</sup> CDR-H1: SEQ ID NO: 129  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 130  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 131  
Набор VL E9.17 CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 241  
<sup>30</sup> CDR-L2: SEQ ID NO: 242  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 243  
Набор VH E9.18 CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 133  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 134  
<sup>35</sup> CDR-H3: SEQ ID NO: 135  
Набор VL E9.18 CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 245  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 246  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 247  
<sup>40</sup> Набор VH E9.19 CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 137  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 138  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 139  
Набор VL E9.19 CDR  
<sup>45</sup> CDR-L1: SEQ ID NO: 249  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 250  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 251  
Набор VH E9.22 CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 141  
CDR-H2: SEQ ID NO: 142  
CDR-H3: SEQ ID NO: 143  
Набор VL E9.22 CDR  
5 CDR-L1: SEQ ID NO: 253  
CDR-L2: SEQ ID NO: 254  
CDR-L3: SEQ ID NO: 255  
Набор VH E9.48 CDR  
CDR-H1: SEQ ID NO: 145  
10 CDR-H2: SEQ ID NO: 146  
CDR-H3: SEQ ID NO: 147  
Набор VL E9.48 CDR  
CDR-L1: SEQ ID NO: 257  
CDR-L2: SEQ ID NO: 258  
15 CDR-L3: SEQ ID NO: 259  
Набор VH E9.65 CDR  
CDR-H1: SEQ ID NO: 149  
CDR-H2: SEQ ID NO: 150  
CDR-H3: SEQ ID NO: 151  
20 Набор VL E9.65 CDR  
CDR-L1: SEQ ID NO: 261  
CDR-L2: SEQ ID NO: 262  
CDR-L3: SEQ ID NO: 263  
Набор VH E9.66 CDR  
CDR-H1: SEQ ID NO: 153  
25 CDR-H2: SEQ ID NO: 154  
CDR-H3: SEQ ID NO: 155  
Набор VL E9.66 CDR  
CDR-L1: SEQ ID NO: 265  
30 CDR-L2: SEQ ID NO: 266  
CDR-L3: SEQ ID NO: 267  
Набор VH E9.71 CDR  
CDR-H1: SEQ ID NO: 157  
CDR-H2: SEQ ID NO: 158  
35 CDR-H3: SEQ ID NO: 159  
Набор VL E9.71 CDR  
CDR-L1: SEQ ID NO: 269  
CDR-L2: SEQ ID NO: 270  
CDR-L3: SEQ ID NO: 271  
40 Набор VH E9.13 CDR  
CDR-H1: SEQ ID NO: 161  
CDR-H2: SEQ ID NO: 162  
CDR-H3: SEQ ID NO: 163  
Набор VL E9.13 CDR  
45 CDR-L1: SEQ ID NO: 217  
CDR-L2: SEQ ID NO: 218  
CDR-L3: SEQ ID NO: 219  
Набор VH E9.16 CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 165  
CDR-H2: SEQ ID NO: 166  
CDR-H3: SEQ ID NO: 167  
Набор VL E9.16 CDR  
5 CDR-L1: SEQ ID NO: 221  
CDR-L2: SEQ ID NO: 222  
CDR-L3: SEQ ID NO: 223  
Набор VH E9.38 CDR  
CDR-H1: SEQ ID NO: 169  
10 CDR-H2: SEQ ID NO: 170  
CDR-H3: SEQ ID NO: 171  
Набор VL E9.38 CDR  
CDR-L1: SEQ ID NO: 225  
CDR-L2: SEQ ID NO: 226  
15 CDR-L3: SEQ ID NO: 227  
Набор VH E9.2B CDR  
CDR-H1: SEQ ID NO: 173  
CDR-H2: SEQ ID NO: 174  
CDR-H3: SEQ ID NO: 175  
20 Набор VL E9.2B CDR  
CDR-L1: SEQ ID NO: 273  
CDR-L2: SEQ ID NO: 274  
CDR-L3: SEQ ID NO: 275  
Набор VH E9.1F CDR  
CDR-H1: SEQ ID NO: 177  
25 CDR-H2: SEQ ID NO: 178  
CDR-H3: SEQ ID NO: 179  
Набор VL E9.1F CDR  
CDR-L1: SEQ ID NO: 277  
30 CDR-L2: SEQ ID NO: 278  
CDR-L3: SEQ ID NO: 279  
Набор VH E9.10H CDR  
CDR-H1: SEQ ID NO: 181  
CDR-H2: SEQ ID NO: 182  
35 CDR-H3: SEQ ID NO: 183  
Набор VL E9.10H CDR  
CDR-L1: SEQ ID NO: 301  
CDR-L2: SEQ ID NO: 302  
CDR-L3: SEQ ID NO: 303  
40 Набор VH E9.5E CDR  
CDR-H1: SEQ ID NO: 185  
CDR-H2: SEQ ID NO: 186  
CDR-H3: SEQ ID NO: 187  
Набор VL E9.5E CDR  
45 CDR-L1: SEQ ID NO: 293  
CDR-L2: SEQ ID NO: 294  
CDR-L3: SEQ ID NO: 295  
Набор VH E9.10C CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 189  
CDR-H2: SEQ ID NO: 190  
CDR-H3: SEQ ID NO: 191  
Набор VL E9.10C CDR  
5 CDR-L1: SEQ ID NO: 281  
CDR-L2: SEQ ID NO: 282  
CDR-L3: SEQ ID NO: 283  
Набор VH E9.7E CDR  
CDR-H1: SEQ ID NO: 193  
10 CDR-H2: SEQ ID NO: 194  
CDR-H3: SEQ ID NO: 195  
Набор VL E9.7E CDR  
CDR-L1: SEQ ID NO: 289  
CDR-L2: SEQ ID NO: 290  
15 CDR-L3: SEQ ID NO: 291  
Набор VH E9.12B CDR  
CDR-H1: SEQ ID NO: 197  
CDR-H2: SEQ ID NO: 198  
CDR-H3: SEQ ID NO: 199  
20 Набор VL E9.12B CDR  
CDR-L1: SEQ ID NO: 297  
CDR-L2: SEQ ID NO: 298  
CDR-L3: SEQ ID NO: 299  
Набор VH E9.10E CDR  
CDR-H1: SEQ ID NO: 201  
25 CDR-H2: SEQ ID NO: 202  
CDR-H3: SEQ ID NO: 203  
Набор VL E9.10E CDR  
CDR-L1: SEQ ID NO: 285  
30 CDR-L2: SEQ ID NO: 286  
CDR-L3: SEQ ID NO: 287  
Набор VH E9.6A CDR  
CDR-H1: SEQ ID NO: 205  
CDR-H2: SEQ ID NO: 206  
35 CDR-H3: SEQ ID NO: 207  
Набор VL E9.6A CDR  
CDR-L1: SEQ ID NO: 305  
CDR-L2: SEQ ID NO: 306  
CDR-L3: SEQ ID NO: 307  
40 Набор VH E9.7A CDR  
CDR-H1: SEQ ID NO: 209  
CDR-H2: SEQ ID NO: 210  
CDR-H3: SEQ ID NO: 211  
Набор VL E9.7A CDR  
CDR-L1: SEQ ID NO: 309  
45 CDR-L2: SEQ ID NO: 310  
CDR-L3: SEQ ID NO: 311  
Набор VH E9.8H CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 213

CDR-H2: SEQ ID NO: 214

CDR-H3: SEQ ID NO: 215

Набор VL E9.8H CDR

5 CDR-L1: SEQ ID NO: 313

CDR-L2: SEQ ID NO: 314

CDR-L3: SEQ ID NO: 315

Набор VH E9.1 CDR

CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 334

10 CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 334

CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 334

Набор VL E9.1 CDR

CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 335

CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 335

15 CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 335

Набор VH E9-SE1 CDR

CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 336

CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 336

CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 336

20 Набор VL E9-SE1 CDR

CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 337

CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 337

CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 337

Набор VH E9-SE2 CDR

25 CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 338

CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 338

CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 338

Набор VL E9-SE2 CDR

CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 339

30 CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 339

CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 339

Набор VH E9-SE3 CDR

CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 340

CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 340

35 CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 340

Набор VL E9-SE3 CDR

CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 341

CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 341

CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 341

40 Набор VH E9-SE4 CDR

CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 342

CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 342

CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 342

Набор VL E9-SE4 CDR

45 CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 343

CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 343

CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 343

Набор VH E9-SE5 CDR

CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 344  
CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 344  
CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 344

Набор VL E9-SE5 CDR

5 CDR-L1: остатки 24-34 SEQ ID NO: 345  
CDR-L2: остатки 50-56 SEQ ID NO: 345  
CDR-L3: остатки 89-97 SEQ ID NO: 345

Набор VH E9-SE6 CDR

10 CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 346  
CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 346  
CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 346

Набор VL E9-SE6 CDR

15 CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 347  
CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 347  
CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 347

Набор VH E9-SE7 CDR

20 CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 348  
CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 348  
CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 348

Набор VL E9-SE7 CDR

25 CDR-L1: остатки 24-34 SEQ ID NO: 349  
CDR-L2: остатки 50-56 SEQ ID NO: 349  
CDR-L3: остатки 89-97 SEQ ID NO: 349

Набор VH E9-SE8 CDR

30 CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 350  
CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 350  
CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 350

Набор VL E9-SE8 CDR

35 CDR-L1: остатки 24-34 SEQ ID NO: 351  
CDR-L2: остатки 50-56 SEQ ID NO: 351  
CDR-L3: остатки 89-97 SEQ ID NO: 351

Набор VH E9-FR1 CDR

40 CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 352  
CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 352  
CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 352

Набор VL E9-FR1 CDR

45 CDR-L1: остатки 24-34 SEQ ID NO: 353  
CDR-L2: остатки 50-56 SEQ ID NO: 353  
CDR-L3: остатки 89-97 SEQ ID NO: 353

Набор VH E9-FR2 CDR

CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 354  
CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 354  
CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 354

Набор VL E9-FR2 CDR

45 CDR-L1: остатки 24-34 SEQ ID NO: 355  
CDR-L2: остатки 50-56 SEQ ID NO: 355  
CDR-L3: остатки 89-97 SEQ ID NO: 355

Набор VH E9.71 CDR

CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 356  
 CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 356  
 CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 356

Набор VL E9.71 CDR

5 CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 357  
 CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 357  
 CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 357

Набор VH E9.71(M) CDR

10 CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 358  
 CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 358  
 CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 358

Набор VL E9.71(M) CDR

15 CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 359  
 CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 359  
 CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 359

Набор VH E9.71(L) CDR

CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 360  
 CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 360  
 CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 360

Набор VL E9.71(L) CDR

20 CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 361  
 CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 361  
 CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 361.

В другом варианте изобретения связывающий белок содержит набор из 3 CDR

25 вариабельных тяжелых цепей (VH), выбранных из любого набора из 3 CDR VH в вышеуказанной группе, и набор из 3 CDR вариабельных легких цепей (VL), выбранных из любого набора из 3 CDR VL в вышеуказанной группе.

30 В другом варианте изобретения связывающий белок содержит набор из 3 CDR цепей, обозначенных VH, и набор из 3 CDR цепей, соответственно обозначенных VL, в вышеуказанной группе. Предпочтительно, связывающий белок согласно изобретению содержит по меньшей мере два набора CDR вариабельных доменов, выбранные из группы наборов CDR вариабельных доменов, состоящей из:

набора VH E9 CDR и набора VL E9 CDR,  
 набора VH E9.4 CDR и набора VL E9.4 CDR,  
 35 набора VH E9.11 CDR и набора VL E9.11 CDR,  
 набора VH E9.14 CDR и набора VL E9.14 CDR,  
 набора VH E9.17 CDR и набора VL E9.17 CDR,  
 набора VH E9.18 CDR и набора VL E9.18 CDR,  
 набора VH E9.19 CDR и набора VL E9.19 CDR,  
 40 набора VH E9.22 CDR и набора VL E9.22 CDR,  
 набора VH E9.48 CDR и набора VL E9.48 CDR,  
 набора VH E9.65 CDR и набора VL E9.65 CDR,  
 набора VH E9.66 CDR и набора VL E9.66 CDR,  
 набора VH E9.71 CDR и набора VL E9.71 CDR,  
 45 набора VH E9.13 CDR и набора VL E9.13 CDR,  
 набора VH E9.16 CDR и набора VL E9.16 CDR,  
 набора VH E9.38 CDR и набора VL E9.38 CDR,  
 набора VH E9.2B CDR и набора VL E9.2B CDR,

набора VH E9.1F CDR и набора VL E9.1F CDR,  
набора VH E9.10H CDR и набора VL E9.10H CDR,  
набора VH E9.5E CDR и набора VL E9.5E CDR,  
набора VH E9.10C CDR и набора VL E9.10C CDR,  
набора VH E9.7E CDR и набора VL E9.7E CDR,  
набора VH E9.12B CDR и набора VL E9.12B CDR,  
набора VH E9.10E CDR и набора VL E9.10E CDR,  
набора VH E9.6A CDR и набора VL E9.6A CDR,  
набора VH E9.7A CDR и набора VL E9.7A CDR,  
набора VH E9.8H CDR и набора VL E9.8H CDR,  
набора VH E9-SE1 CDR и набора VL E9-SE1 CDR,  
набора VH E9-SE2 CDR и набора VL E9-SE2 CDR,  
набора VH E9-SE3 CDR и набора VL E9-SE3 CDR,  
набора VH E9-SE4 CDR и набора VL E9-SE4 CDR,  
набора VH E9-SE5 CDR и набора VL E9-SE5 CDR,  
набора VH E9-SE6 CDR и набора VL E9-SE6 CDR,  
набора VH E9-SE7 CDR и набора VL E9-SE7 CDR,  
набора VH E9-SE8 CDR и набора VL E9-SE8 CDR,  
набора VH E9-FR1 CDR и набора VL E9-FR1 CDR,  
набора VH E9-FR2 CDR и набора VL E9-FR2 CDR,  
набора VH E9.71 CDR и набора VL E9.71 CDR,  
набора VH E9.71(M) CDR и набора VL E9.71(M) CDR, и  
набора VH E9.71(L) CDR и набора VL E9.71(L) CDR.

В другом варианте изобретения описанный выше связывающий белок также содержит

человеческую акцепторную каркасную область. Предпочтительно, человеческая акцепторная каркасная область содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

последовательностей акцепторной каркасной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 6-22,

акцепторных последовательностей тяжелой цепи SEQ ID NO: 35-62,  
акцепторных последовательностей легкой цепи SEQ ID NO: 23-34, и  
акцепторных последовательностей легкой цепи SEQ ID NO: 63-98.

В другом варианте изобретения вышеописанный связывающий белок содержит человеческую акцепторную каркасную область, которая включает по меньшей мере

одну аминокислотную замену в каркасной области, где указанная аминокислотная последовательность каркасной области по меньшей мере на 65% идентична последовательности указанной человеческой акцепторной каркасной области и содержит по меньшей мере 70 аминокислотных остатков, идентичных остаткам указанной человеческой акцепторной каркасной области.

В другом варианте изобретения описанный здесь связывающий белок содержит человеческую акцепторную каркасную область, включающую по меньшей мере одну аминокислотную замену в каркасной области в положении ключевого остатка, где указанный ключевой остаток выбран из группы, состоящей из:

остатка, смежного с CDR;

остатка сайта гликозилирования;

редкого остатка;

остатка, способного взаимодействовать с человеческим DLL4;

канонического остатка;

остатка зоны контактирования вариабельной области тяжелой цепи с вариабельной областью легкой цепи;

остатка в зоне Верньера; и

остатка в области, которая перекрывает с областью CDR1 вариабельной тяжелой

5 цепи, определенной по Чотиа, и с первой каркасной областью тяжелой цепи, определенной по Кэбату. Предпочтительно, ключевой остаток выбран из группы, состоящей из: 2Н, 4Н, 24Н, 26Н, 27Н, 29Н, 34Н, 35Н, 37Н, 39Н, 44Н, 45Н, 47Н, 48Н, 49Н, 50Н, 51Н, 58Н, 59Н, 60Н, 63Н, 67Н, 69Н, 71Н, 73Н, 76Н, 78Н, 91Н, 93Н, 94Н, 2Л, 4Л, 25Л, 29Л, 27bЛ, 33Л, 34Л, 36Л, 38Л, 43Л, 44Л, 46Л, 47Л, 48Л, 49Л, 55Л, 58Л, 62Л, 64Л, 71Л, 87Л,

10 89Л, 90Л, 91Л, 94Л, 95Л.

В другом варианте изобретения описанный здесь связывающий белок содержит консенсусный человеческий вариабельный домен.

В предпочтительном варианте изобретения вышеописанный связывающий белок содержит по меньшей мере один вариабельный домен, имеющий аминокислотную

15 последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1, 111, 116, 228, 120, 232, 124, 236, 128, 240, 132, 244, 136, 248, 140, 252, 144, 256, 148, 260, 152, 264, 156, 268, 160, 216, 164, 220, 168, 224, 172, 272, 176, 276, 180, 300, 184, 292, 188, 280, 192, 288, 196, 296, 200, 284, 204, 304, 208, 308, 212, 312, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360 и 361.

20 В другом варианте изобретения связывающий белок согласно изобретению содержит два вариабельных домена, где указанные два вариабельных домена имеют аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1 и 111, SEQ ID NO: 116 и 228, SEQ ID NO: 120 и 232, SEQ ID NO: 124 и 236, SEQ ID NO: 128 и 240, SEQ ID NO: 132 и 244, SEQ ID NO: 136 и 248, SEQ ID NO: 140 и 252, SEQ ID NO: 144 и 256, SEQ ID NO: 148 и 260, SEQ ID NO: 152 и 264, SEQ ID NO: 156 и 268, SEQ ID NO: 160 и 216, SEQ ID NO: 164 и 220, SEQ ID NO: 168 и 224, SEQ ID NO: 172 и 272, SEQ ID NO: 176 и 276, SEQ ID NO: 180 и 300, SEQ ID NO: 184 и 292, SEQ ID NO: 188 и 280, SEQ ID NO: 192 и 288, SEQ ID NO: 196 и 296, SEQ ID NO: 200 и 284, SEQ ID NO: 204 и 304, SEQ ID NO: 208 и 308, SEQ ID NO: 212 и 312, SEQ ID NO: 334 и 335, SEQ ID NO: 336 и 337, SEQ ID NO: 338 и 339, SEQ ID NO: 340 и 341, SEQ ID NO: 342 и 343, SEQ ID NO: 344 и 345, SEQ ID NO: 346 и 347, SEQ ID NO: 348 и 349, SEQ ID NO: 350 и 351, SEQ ID NO: 352 и 353, SEQ ID NO: 354 и 355, SEQ ID NO: 356 и 357, SEQ ID NO: 358 и 359, SEQ ID NO: 360 и 361.

35 В одном из вариантов изобретения связывающий белок согласно изобретению содержит вариабельный домен тяжелой цепи ( $V_H$ ), где, предпочтительно,  $V_H$  включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 1, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358 и 360.

40 В другом варианте изобретения связывающий белок согласно изобретению содержит вариабельный домен легкой цепи ( $V_L$ ), где, предпочтительно,  $V_L$  включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 111, 228, 232, 236, 240, 244, 248, 252, 256, 260, 264, 268, 216, 220, 224, 272, 276, 300, 292, 280, 288, 296, 284, 304, 308, 312, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357, 359 и 361.

45 В предпочтительном варианте изобретения связывающий белок согласно изобретению содержит  $V_H$  и  $V_L$ , где, предпочтительно,  $V_H$  и  $V_L$  представляют собой любую из

описанных выше последовательностей.

В другом варианте настоящее изобретение относится к связывающему белку, обладающему способностью связываться с человеческим DLL-4, где указанный связывающий белок содержит:

- 5 константную область тяжелой цепи Ig, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3;
- константную область легкой цепи Ig, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5;
- 10 вариабельную область тяжелой цепи Ig, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:  
SEQ ID NO: 1, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358 и 360; и
- 15 вариабельную область легкой цепи Ig, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:  
SEQ ID NO: 111, 228, 232, 236, 240, 244, 248, 252, 256, 260, 264, 268, 216, 220, 224, 272, 276, 300, 292, 280, 288, 296, 284, 304, 308, 312, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357, 359 и 361.
- 20 В другом аспекте настоящее изобретение относится к связывающему белку, содержащему антигенсвязывающий домен, обладающий способностью связываться с человеческим DLL4, где указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну или несколько CDR, выбранных из группы, состоящей из:  
CDR-H1: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 105), где
- 25 X<sub>1</sub> представляет собой S, N или D;  
X<sub>2</sub> представляет собой H или Y;  
X<sub>3</sub> представляет собой W;  
X<sub>4</sub> представляет собой M;
- 30 X<sub>5</sub> представляет собой S или H;  
CDR-H2: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub>-X<sub>17</sub> (SEQ ID NO: 106), где:  
X<sub>1</sub> представляет собой I, D, M или T;
- 35 X<sub>2</sub> представляет собой I;  
X<sub>3</sub> представляет собой S;  
X<sub>4</sub> представляет собой Y, N, S, Q, V, T, H или D;  
X<sub>5</sub> представляет собой D;
- 40 X<sub>6</sub> представляет собой G;  
X<sub>7</sub> представляет собой S, R, I, T, G, K, H или N;  
X<sub>8</sub> представляет собой N, Y, S, I или T;  
X<sub>9</sub> представляет собой K, M, N, Q, E, T, R, S, A или L;
- 45 X<sub>10</sub> представляет собой Y, D или E;  
X<sub>11</sub> представляет собой S или Y;  
X<sub>12</sub> представляет собой A;  
X<sub>13</sub> представляет собой D;

X<sub>14</sub> представляет собой S;

X<sub>15</sub> представляет собой V;

X<sub>16</sub> представляет собой K; и

5 X<sub>17</sub> представляет собой G;

CDR-H3: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub> (SEQ ID NO: 107), где:

X<sub>1</sub> представляет собой A;

10 X<sub>2</sub> представляет собой G, A или R;

X<sub>3</sub> представляет собой G;

X<sub>4</sub> представляет собой G, S или A;

X<sub>5</sub> представляет собой N;

X<sub>6</sub> представляет собой V или M;

15 X<sub>7</sub> представляет собой G;

X<sub>8</sub> представляет собой F, L, Y или M;

X<sub>9</sub> представляет собой D; и

X<sub>10</sub> представляет собой I, S или L;

CDR-L1: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub> (SEQ ID NO: 108), где:

20 X<sub>1</sub> представляет собой S;

X<sub>2</sub> представляет собой A или G;

X<sub>3</sub> представляет собой D;

25 X<sub>4</sub> представляет собой K, N, L, Q, M, E, S, T, G или D;

X<sub>5</sub> представляет собой L;

X<sub>6</sub> представляет собой G;

X<sub>7</sub> представляет собой T, S, N, A, G или E;

X<sub>8</sub> представляет собой K, Q, N или R;

30 X<sub>9</sub> представляет собой Y;

X<sub>10</sub> представляет собой V или I; и

X<sub>11</sub> представляет собой S;

CDR-L2: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 109), где:

35 X<sub>1</sub> представляет собой Q;

X<sub>2</sub> представляет собой D;

X<sub>3</sub> представляет собой A, G, W, S или D;

X<sub>4</sub> представляет собой K, M, Q, N, L, T, I или E;

40 X<sub>5</sub> представляет собой R;

X<sub>6</sub> представляет собой P; и

X<sub>7</sub> представляет собой S; и

CDR-L3: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub> (SEQ ID NO: 110), где:

45 X<sub>1</sub> представляет собой Q;

X<sub>2</sub> представляет собой S или A;

X<sub>3</sub> представляет собой W;

X<sub>4</sub> представляет собой D;

X<sub>5</sub> представляет собой R, S, Q, P, A, V, W или M;

X<sub>6</sub> представляет собой S, G, I, N, R или T;

<sup>5</sup> X<sub>7</sub> представляет собой D или G;

X<sub>8</sub> представляет собой V, A, P или E; и

X<sub>9</sub> представляет собой V.

Предпочтительно, антигенсвязывающий домен DLL4-связывающего белка согласно изобретению содержит по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

остатков 31-35 SEQ ID NO: 112 (CDR-H1); остатков 50-66 SEQ ID NO: 112 (CDR-H2);  
остатков 99-108 SEQ ID NO: 112 (CDR-H3);

остатков 23-33 SEQ ID NO: 113 (CDR-L1); остатков 49-55 SEQ ID NO: 113 (CDR-L2);  
остатков 88-96 SEQ ID NO: 113 (CDR-L3);

<sup>15</sup> остатков 31-35 SEQ ID NO: 316 (CDR-H1); остатков 50-66 SEQ ID NO: 316 (CDR-H2);  
остатков 99-108 SEQ ID NO: 316 (CDR-H3);

остатков 31-35 SEQ ID NO: 317 (CDR-H1); остатков 50-66 SEQ ID NO: 317 (CDR-H2);  
остатков 99-108 SEQ ID NO: 317 (CDR-H3);

<sup>20</sup> остатков 31-35 SEQ ID NO: 318 (CDR-H1); остатков 50-66 SEQ ID NO: 318 (CDR-H2);  
остатков 99-108 SEQ ID NO: 318 (CDR-H3);

остатков 31-35 SEQ ID NO: 319 (CDR-H1); остатков 50-66 SEQ ID NO: 319 (CDR-H2);  
остатков 99-108 SEQ ID NO: 319 (CDR-H3);

остатков 31-35 SEQ ID NO: 320 (CDR-H1); остатков 50-66 SEQ ID NO: 320 (CDR-H2);  
остатков 99-108 SEQ ID NO: 320 (CDR-H3);

<sup>25</sup> остатков 31-35 SEQ ID NO: 321 (CDR-H1); остатков 50-66 SEQ ID NO: 321 (CDR-H2);  
остатков 99-108 SEQ ID NO: 321 (CDR-H3);

остатков 31-35 SEQ ID NO: 322 (CDR-H1); остатков 50-66 SEQ ID NO: 322 (CDR-H2);  
остатков 99-108 SEQ ID NO: 322 (CDR-H3);

<sup>30</sup> остатков 31-35 SEQ ID NO: 323 (CDR-H1); остатков 50-66 SEQ ID NO: 323 (CDR-H2);  
остатков 99-108 SEQ ID NO: 323 (CDR-H3);

остатков 31-35 SEQ ID NO: 324 (CDR-H1); остатков 50-66 SEQ ID NO: 324 (CDR-H2);  
остатков 99-108 SEQ ID NO: 324 (CDR-H3);

остатков 31-35 SEQ ID NO: 325 (CDR-H1); остатков 50-66 SEQ ID NO: 325 (CDR-H2);  
остатков 99-108 SEQ ID NO: 325 (CDR-H3);

<sup>35</sup> остатков 31-35 SEQ ID NO: 326 (CDR-H1); остатков 50-66 SEQ ID NO: 326 (CDR-H2);  
остатков 99-108 SEQ ID NO: 326 (CDR-H3);

остатков 23-33 SEQ ID NO: 327 (CDR-L1); остатков 49-55 SEQ ID NO: 327 (CDR-L2);  
остатков 88-96 SEQ ID NO: 327 (CDR-L3);

остатков 23-33 SEQ ID NO: 328 (CDR-L1); остатков 49-55 SEQ ID NO: 328 (CDR-L2);  
остатков 88-96 SEQ ID NO: 328 (CDR-L3);

остатков 23-33 SEQ ID NO: 329 (CDR-L1); остатков 49-55 SEQ ID NO: 329 (CDR-L2);  
остатков 88-96 SEQ ID NO: 329 (CDR-L3);

остатков 23-33 SEQ ID NO: 330 (CDR-L1); остатков 49-55 SEQ ID NO: 330 (CDR-L2);  
остатков 88-96 SEQ ID NO: 330 (CDR-L3);

<sup>45</sup> остатков 23-33 SEQ ID NO: 331 (CDR-L1); остатков 49-55 SEQ ID NO: 331 (CDR-L2);  
остатков 88-96 SEQ ID NO: 331 (CDR-L3);

остатков 23-33 SEQ ID NO: 332 (CDR-L1); остатков 49-55 SEQ ID NO: 332 (CDR-L2);  
остатков 88-96 SEQ ID NO: 332 (CDR-L3);

остатков 23-33 SEQ ID NO: 333 (CDR-L1); остатков 49-55 SEQ ID NO: 333 (CDR-L2); остатков 88-96 SEQ ID NO: 333 (CDR-L3).

В другом варианте изобретения связывающий белок содержит по меньшей мере 3 CDR, описанных выше.

5 Предпочтительно, DLL4-связывающий белок согласно изобретению содержит одну или несколько описанных выше CDR. Более предпочтительно, указанный связывающий белок содержит три или более CDR, описанных выше. Наиболее предпочтительно, DLL4-связывающий белок согласно изобретению содержит шесть CDR, описанных выше, то есть CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, описанные выше.

10 В предпочтительном варианте изобретения связывающий белок содержит по меньшей мере 3 CDR, выбранных из группы, состоящей из описанных выше последовательностей.

В другом предпочтительном варианте изобретения, связывающий белок содержит 3 CDR, выбранных из набора CDR вариабельного домена, выбранного из нижеследующей группы:

15 набор VH A10 CDR

CDR-H1: остатки 31-35 SEQ ID NO: 112

CDR-H2: остатки 50-66 SEQ ID NO: 112

CDR-H3: остатки 99-108 SEQ ID NO: 112

набор VL A10 CDR

20 CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 113

CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 113

CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 113

набор VH A10.3 CDR

CDR-H1: остатки 31-35 SEQ ID NO: 316

25 CDR-H2: остатки 50-66 SEQ ID NO: 316

CDR-H3: остатки 99-108 SEQ ID NO: 316

набор VL A10.3 CDR

CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 327

CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 327

30 CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 327

набор VH A10.K30 CDR

CDR-H1: остатки 31-35 SEQ ID NO: 317

CDR-H2: остатки 50-66 SEQ ID NO: 317

CDR-H3: остатки 99-108 SEQ ID NO: 317

35 набор VH A10.K42 CDR

CDR-H1: остатки 31-35 SEQ ID NO: 318

CDR-H2: остатки 50-66 SEQ ID NO: 318

CDR-H3: остатки 99-108 SEQ ID NO: 318

набор VH A10.9A CDR

40 CDR-H1: остатки 31-35 SEQ ID NO: 319

CDR-H2: остатки 50-66 SEQ ID NO: 319

CDR-H3: остатки 99-108 SEQ ID NO: 319

набор VH A10.8A CDR

CDR-H1: остатки 31-35 SEQ ID NO: 320

45 CDR-H2: остатки 50-66 SEQ ID NO: 320

CDR-H3: остатки 99-108 SEQ ID NO: 320

набор VH A10.1A CDR

CDR-H1: остатки 31-35 SEQ ID NO: 321

CDR-H2: остатки 50-66 SEQ ID NO: 321  
 CDR-H3: остатки 99-108 SEQ ID NO: 321  
набор VH A10.5D CDR  
 CDR-H1: остатки 31-35 SEQ ID NO: 322  
<sup>5</sup> CDR-H2: остатки 50-66 SEQ ID NO: 322  
 CDR-H3: остатки 99-108 SEQ ID NO: 322  
набор VH A10.3A CDR  
 CDR-H1: остатки 31-35 SEQ ID NO: 323  
 CDR-H2: остатки 50-66 SEQ ID NO: 323  
<sup>10</sup> CDR-H3: остатки 99-108 SEQ ID NO: 323  
набор VL A10.3A CDR  
 CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 330  
 CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 330  
 CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 330  
<sup>15</sup> набор VH A10.6B CDR  
 CDR-H1: остатки 31-35 SEQ ID NO: 324  
 CDR-H2: остатки 50-66 SEQ ID NO: 324  
 CDR-H3: остатки 99-108 SEQ ID NO: 324  
набор VL A10.6B CDR  
<sup>20</sup> CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 331  
 CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 331  
 CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 331  
набор VH A10.3D CDR  
 CDR-H1: остатки 31-35 SEQ ID NO: 325  
<sup>25</sup> CDR-H2: остатки 50-66 SEQ ID NO: 325  
 CDR-H3: остатки 99-108 SEQ ID NO: 325  
набор VL A10.3D CDR  
 CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 332  
 CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 332  
<sup>30</sup> CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 332  
набор VH A10.4C CDR  
 CDR-H1: остатки 31-35 SEQ ID NO: 326  
 CDR-H2: остатки 50-66 SEQ ID NO: 326  
 CDR-H3: остатки 99-108 SEQ ID NO: 326  
<sup>35</sup> набор VL A10.4C CDR  
 CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 333  
 CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 333  
 CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 333  
набор VL A10.L45 CDR  
<sup>40</sup> CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 328  
 CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 328  
 CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 328  
набор VL A10.L73 CDR  
 CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 329  
<sup>45</sup> CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 329  
 CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 329.

В другом варианте изобретения связывающий белок содержит набор из 3 CDR вариабельных тяжелых цепей (VH), выбранных из любого набора из 3 CDR VH в

вышеуказанной группе, и набор из 3 CDR вариабельных легких цепей (VL), выбранных из любого набора из 3 CDR VL в вышеуказанной группе.

В другом варианте изобретения связывающий белок содержит набор из 3 CDR цепей, обозначенных VH, и набор из 3 CDR цепей, соответственно обозначенных VL в

5 вышеуказанной группе. Предпочтительно, связывающий белок согласно изобретению содержит по меньшей мере два набора CDR вариабельных доменов, выбранные из группы наборов CDR вариабельных доменов, состоящей из:

набора VH A10 CDR и набора VL A10 CDR;

набора VH A10.3 CDR и набора VL A10.3 CDR;

10 набора VH A10.3A CDR и набора VL A10.3A;

набора VH A10.6B CDR и набора VL A10.6B;

набора VH A10.3D CDR и набора VL A10.3D CDR;

набора VH A10.4C CDR и набора VL A10.4C CDR;

набора VH A10.K30 CDR и набора VL A10.3 CDR;

15 набора VH A10.K42 CDR и набора VL A10.3 CDR;

набора VH A10.3 CDR и набора VL A10.L45 CDR;

набора VH A10.3 CDR и набора VL A10.L73 CDR;

набора VH A10.9A CDR и набора VL A10.3 CDR;

набора VH A10.8A CDR и набора VL A10.3 CDR;

20 набора VH A10.1A CDR и набора VL A10.3 CDR; и

набора VH A10.5D CDR и набора VL A10.3 CDR.

В другом варианте изобретения описанный выше связывающий белок также содержит человеческую акцепторную каркасную область. Предпочтительно, человеческая акцепторная каркасная область содержит аминокислотную последовательность,

25 выбранную из группы, состоящей из:

последовательностей акцепторной каркасной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 6-22,

акцепторных последовательностей тяжелой цепи SEQ ID NO: 35-62,

акцепторных последовательностей легкой цепи SEQ ID NO: 23-34 и

30 акцепторных последовательностей легкой цепи SEQ ID NO: 63-98.

В другом варианте изобретения вышеописанный связывающий белок содержит человеческую акцепторную каркасную область, которая включает по меньшей мере одну аминокислотную замену в каркасной области, где указанная аминокислотная последовательность каркасной области по меньшей мере на 65% идентична

35 последовательности указанной человеческой акцепторной каркасной области и содержит по меньшей мере 70 аминокислотных остатков, идентичных остаткам указанной человеческой акцепторной каркасной области.

В другом варианте изобретения описанный здесь связывающий белок содержит человеческую акцепторную каркасную область, включающую по меньшей мере одну

40 аминокислотную замену в каркасной области в положении ключевого остатка, где указанный ключевой остаток выбран из группы, состоящей из:

остатка, смежного с CDR;

остатка сайта гликозилирования;

редкого остатка;

45 остатка, способного взаимодействовать с человеческим DLL4;

канонического остатка;

остатка зоны контактирования вариабельной области тяжелой цепи с вариабельной областью легкой цепи;

остатка в зоне Верньера; и

остатка в области, которая перекрываетя с областью CDR1 вариабельной тяжелой цепи, определенной по Чотиа, и с первой каркасной областью тяжелой цепи, определенной по Кэбату. Предпочтительно, ключевой остаток выбран из группы,

5 состоящей из: 2H, 4H, 24H, 26H, 27H, 29H, 34H, 35H, 37H, 39H, 44H, 45H, 47H, 48H, 49H, 50H, 51H, 58H, 59H, 60H, 63H, 67H, 69H, 71H, 73H, 76H, 78H, 91H, 93H, 94H, 2L, 4L, 25L, 29L, 27bL, 33L, 34L, 36L, 38L, 43L, 44L, 46L, 47L, 48L, 49L, 55L, 58L, 62L, 64L, 71L, 87L, 89L, 90L, 91L, 94L, 95L.

В другом варианте изобретения описанный здесь связывающий белок содержит 10 консенсусный человеческий вариабельный домен.

В предпочтительном варианте изобретения вышеописанный связывающий белок содержит по меньшей мере один вариабельный домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 112, 113, 316, 327, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 330, 324, 331, 325, 332, 326, 333, 328 и 329.

15 В другом варианте изобретения вышеописанный связывающий белок содержит два вариабельных домена, где указанные два вариабельных домена имеют аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 112 и 113, SEQ ID NO: 316 и 327, SEQ ID NO: 323 и 330, SEQ ID NO: 324 и 331, SEQ ID NO: 325 и 332 и SEQ ID NO: 326 и 333.

20 В одном из вариантов изобретения связывающий белок согласно изобретению содержит вариабельный домен тяжелой цепи ( $V_H$ ), где, предпочтительно,  $V_H$  включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 112, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325 и 326.

25 В другом варианте изобретения связывающий белок согласно изобретению содержит вариабельный домен легкой цепи ( $V_L$ ), где, предпочтительно,  $V_L$  включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 113, 327, 328, 329, 330, 331, 332 и 333.

30 В другом варианте настоящее изобретение относится к связывающему белку, обладающему способностью связываться с человеческим DLL-4, где указанный связывающий белок содержит:

константную область тяжелой цепи Ig, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3;

35 константную область легкой цепи Ig, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5;

вариабельную область тяжелой цепи Ig, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 112, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325 и 326; и

40 вариабельную область легкой цепи Ig, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 113, 327, 328, 329, 330, 331, 332 и 333.

В соответствии с настоящим изобретением вариабельные домены тяжелой цепи ( $VH$ ) и вариабельные домены легкой цепи ( $VL$ ) DLL4-связывающих белков, описанных в настоящей заявке, могут быть также подвергнуты процедуре перестановки цепей рекомбинантными методами, известными специалистам, в целях получения и отбора дополнительных DLL4-связывающих белков, содержащих различные комбинации описанных здесь доменов  $VH$  и  $VL$ .

В предпочтительном варианте изобретения DLL4-связывающий белок согласно

изобретению связывается с человеческим DLL4 (huDLL4) и по меньшей мере с одним DLL4 другого вида. Более предпочтительно, описанный здесь DLL4-связывающий белок связывается с человеческим DLL4 и DLL4, выбранным из группы, состоящей из мышиного DLL4 (muDLL4), DLL4 яванского макака (DLL4 яванского макака, супо DLL4), крысиного DLL4 и их комбинаций.

5 В другом варианте изобретения DLL4-связывающим белком является полностью человеческое антитело или его антигенсвязывающая часть.

В другом варианте изобретения DLL4-связывающим белком является CDR-привитое антитело. Более предпочтительно, DLL4-связывающий белок представляет собой CDR-10 привитое антитело или его антигенсвязывающую часть, содержащие одну или несколько описанных выше CDR.

Еще более предпочтительно, CDR-привитое антитело или его антигенсвязывающая часть содержат описанный выше вариабельный домен. Более предпочтительно, CDR-привитое антитело или его антигенсвязывающая часть содержат два вышеописанных 15 вариабельных домена. Предпочтительно, CDR-привитое антитело или его антигенсвязывающая часть содержат человеческую акцепторную каркасную область. Более предпочтительно, указанной человеческой акцепторной каркасной областью является любая из вышеописанных человеческих акцепторных каркасных областей.

Более предпочтительно, связывающий белок обладает способностью нейтрализовать 20 активность DLL4, выбранного из группы, состоящей из человеческого DLL4, мышиного DLL4, DLL4 яванского макака, крысиного DLL4 и их комбинаций. Оценка нейтрализации активности DLL4 может быть проведена с помощью нескольких *in vitro* и *in vivo* анализов, известных специалистам. Репрезентативными параметрами для оценки 25 нейтрализации активности DLL4 являются, но не ограничиваются ими, антитела, которые ингибируют взаимодействие DLL4 с рецептором Notch и/или путь передачи Notch-сигнала при величинах IC<sub>50</sub>, составляющих примерно по меньшей мере 10<sup>-6</sup> M; по меньшей мере 10<sup>-7</sup> M; или по меньшей мере 10<sup>-8</sup> M.

В одном из вариантов изобретения связывающий белок согласно изобретению имеет 30 константу скорости ассоциации ( $K_{on}$ ) по отношению к DLL4, составляющую по меньшей мере примерно 10<sup>2</sup> M<sup>-1</sup>c<sup>-1</sup>; по меньшей мере примерно 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>c<sup>-1</sup>; по меньшей мере примерно 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>c<sup>-1</sup>; по меньшей мере примерно 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>c<sup>-1</sup>; или по меньшей мере примерно 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>c<sup>-1</sup>, как было измерено методом поверхностного плазмонного 35 резонанса. Предпочтительно, связывающий белок согласно изобретению имеет константу скорости ассоциации ( $K_{on}$ ) по отношению к DLL4, составляющую в пределах 10<sup>2</sup> M<sup>-1</sup>c<sup>-1</sup> - 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>c<sup>-1</sup>; 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>c<sup>-1</sup> - 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>c<sup>-1</sup>; 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>c<sup>-1</sup> - 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>c<sup>-1</sup>; или 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>c<sup>-1</sup> - 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>c<sup>-1</sup>, как было измерено методом поверхностного плазмонного резонанса.

40 В другом варианте изобретения, связывающий белок согласно изобретению имеет константу скорости диссоциации ( $K_{off}$ ) по отношению к DLL4, составляющую примерно максимум 10<sup>-3</sup> c<sup>-1</sup>; примерно максимум 10<sup>-4</sup> c<sup>-1</sup>; примерно максимум 10<sup>-5</sup> c<sup>-1</sup> или примерно максимум 10<sup>-6</sup> c<sup>-1</sup>, как было измерено методом поверхностного плазмонного резонанса.

45 Предпочтительно, связывающий белок согласно изобретению имеет константу скорости диссоциации ( $K_{off}$ ) по отношению к DLL4, составляющую в пределах 10<sup>-3</sup> c<sup>-1</sup> - 10<sup>-4</sup> c<sup>-1</sup>; 10<sup>-4</sup> c<sup>-1</sup> - 10<sup>-5</sup> c<sup>-1</sup>; или 10<sup>-5</sup> c<sup>-1</sup> - 10<sup>-6</sup> c<sup>-1</sup>, как было измерено методом поверхностного

плазмонного резонанса.

В другом варианте изобретения, связывающий белок согласно изобретению имеет константу диссоциации ( $K_D$ ) по отношению к DLL4, составляющую примерно максимум  $10^{-7}$  М; примерно максимум  $10^{-8}$  М; примерно максимум  $10^{-9}$  М; примерно максимум  $10^{-10}$  М; примерно максимум  $10^{-11}$  М; примерно максимум  $10^{-12}$  М; и максимум  $10^{-13}$  М. Предпочтительно, связывающий белок согласно изобретению имеет константу диссоциации ( $K_D$ ) по отношению к DLL4, составляющую  $10^{-7}$  М -  $10^{-8}$  М;  $10^{-8}$  М -  $10^{-9}$  М;  $10^{-9}$  М -  $10^{-10}$  М;  $10^{-10}$  -  $10^{-11}$  М;  $10^{-11}$  М -  $10^{-12}$  М или  $10^{-12}$  М -  $10^{-13}$  М.

В одном из вариантов настоящее изобретение относится к конструкции антитела, включающей любой из вышеописанных DLL4-связывающих белков и полипептидный линкер или константный домен иммуноглобулина. В предпочтительном варианте изобретения конструкцию антитела согласно изобретению выбирают из группы, состоящей из молекулы иммуноглобулина, моноклонального антитела, химерного антитела, CDR-привитого антитела, гуманизированного антитела, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fv, связанного дисульфидной связью, scFv, однодоменного антитела, диантитела, мультиспецифического антитела, антитела с двойной специфичностью и биспецифического антитела.

В предпочтительном варианте изобретения конструкция антитела согласно изобретению содержит константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, выбранный из группы, состоящей из константного домена человеческого IgM, константного домена человеческого IgG1, константного домена человеческого IgG2, константного домена человеческого IgG3, константного домена человеческого IgG4, константного домена человеческого IgE и константного домена человеческого IgA, и мутантов Ig вышеуказанных подтипов, которые могут модифицировать связывание с рецептором Fc-гамма, связывание с FcRn и связывание с C1q и могут изменять фармакокинетические свойства и/или эффекторные функции Fc.

В другом варианте изобретения конструкция антитела является гликозилированной.

Предпочтительно, указанный профиль гликозилирования является характерным для человека.

В другом варианте изобретения описанный здесь DLL4-связывающий белок конъюгирован с агентом. Конъюгатами связывающего белка согласно изобретению являются конъюгаты антител, в которых описанная здесь конструкция антитела конъюгирована с агентом. Указанный агент предпочтительно выбирают из группы, состоящей из молекулы иммуноадгезина, визуализирующего агента, терапевтического средства и цитотоксического агента. В предпочтительном варианте изобретения визуализирующий агент выбран из группы, состоящей из радиоактивной метки, фермента, флуоресцентной метки, люминесцентной метки, биолюминесцентной метки, магнитной метки и биотина. Более предпочтительно, указанным визуализирующими агентом является радиоактивная метка, выбранная из группы, состоящей из:  $^3$ H,  $^{14}$ C,  $^{35}$ S,  $^{90}$ Y,  $^{99}$ Tc,  $^{111}$ In,  $^{125}$ I,  $^{131}$ I,  $^{177}$ Lu,  $^{166}$ No и  $^{153}$ Sm. В предпочтительном варианте изобретения терапевтическое или цитотоксическое средство выбрано из группы, состоящей из антиметаболита, алкилирующего агента, антибиотика, фактора роста, цитокина, антиangiогенного агента, антимитотического средства, антрациклина, токсина и апоптотического агента.

В другом варианте изобретения описанные выше DLL4-связывающий белок, конструкция антитела или конъюгат связывающего белка (включая конъюгаты антитела)

присутствуют в виде кристаллов. Предпочтительным кристаллом является не содержащий носителя фармацевтический кристалл с контролируемым высвобождением. В предпочтительном варианте изобретения указанные кристаллизованный связывающий белок, кристаллизованная конструкция антитела или кристаллизованный конъюгат

5 антитела имеют более продолжительное время полужизни *in vivo*, чем их растворимый аналог. В другом предпочтительном варианте изобретения указанные кристаллизованный связывающий белок, кристаллизованная конструкция антитела или кристаллизованный конъюгат связывающего белка (включая конъюгат антитела) сохраняют биологическую активность после кристаллизации.

- 10 В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к изолированной нуклеиновой кислоте, кодирующей DLL4-связывающий белок, конструкцию антитела, конъюгат DLL4-связывающего антитела или его DLL4-связывающую часть. Особенно предпочтительной является изолированная нуклеиновая кислота, которая кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из: полипептида, содержащего
- 15 вариабельный домен тяжелой цепи, где указанный вариабельный домен тяжелой цепи включает CDR-H1, CDR-H2 или CDR-H3, описанные выше; полипептида, содержащего вариабельный домен легкой цепи, где указанный вариабельный домен легкой цепи включает CDR-L1, CDR-L2 или CDR-L3, описанные выше, или комбинации обоих полипептидов.

- 20 В другом варианте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему описанную выше изолированную нуклеиновую кислоту. В предпочтительном варианте изобретения указанный вектор выбран из группы, состоящей из: pcDNA, pTT (Durocher et al., *Nucl. Acids Res.*, 30(2e9): 1-9 (2002)), pTT3 (pTT с дополнительными сайтами множественного клонирования), pEFBOS (Mizushima et al., *Nucl. Acids. Res.*, 18 (17): 5322
- 25 (1990)), pHybE, pBV, pJV и pBJ, и любых других экспрессионных векторов, подходящих для их использования в прокариотических или эукариотических клетках.

- В другом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, трансформированной вышеописанным вектором. Указанной клеткой-хозяином может быть прокариотическая или эукариотическая клетка. Предпочтительной
- 30 прокариотической клеткой-хозяином является *Escherichia coli*. Предпочтительно, эукариотическая клетка выбрана из группы, состоящей из клетки протиста, клетки животного, клетки растения и клетки грибов. Более предпочтительно, клеткой-хозяином является клетка млекопитающего, включая, но не ограничиваясь ими, клетки СНО и COS. Предпочтительными клетками грибов являются, но не ограничиваются ими,
- 35 клетки *Saccharomyces cerevisiae*. Предпочтительной клеткой насекомого является клетка Sf9.

- В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу продуцирования связывающего белка, который связывается с человеческим DLL4, где указанный способ включает стадию культивирования любой из вышеописанных клеток-хозяев в
- 40 культуральной среде в условиях, подходящих для продуцирования связывающего белка, который связывается с человеческим DLL4. В другом варианте настоящее изобретение относится к связывающему белку, полученному способом, описанным выше.

- В одном из вариантов настоящее изобретение относится к композиции для высвобождения DLL4-связывающего белка согласно изобретению, где указанная
- 45 композиция содержит состав, который, в свою очередь, содержит кристаллизованный DLL4-связывающий белок, кристаллизованную конструкцию антитела или кристаллизованный конъюгат связывающего белка (включая конъюгаты антитела), описанные выше; и ингредиент, а также по меньшей мере один полимерный носитель.

Предпочтительным полимерным носителем является полимер, выбранный из одной или нескольких групп, состоящих из полиакриловой кислоты, полицианоакрилатов, полиаминокислот, полиангидридов, полидепептидов, полиэфиров, полимолочной кислоты, сополимера молочной и гликолевой кислоты или PLGA, поли- $\beta$ -

- 5 гидроксибутирате, поликапролактона, полидиоксанона, полиэтиленгликоля, полигидроксипропилметакриламида, полиорганофосфазена, полиортэфиров, поливинилового спирта, поливинилпирролидона, сополимеров малеинового ангидрида-алкилвинилового эфира, полиолов плюроников, альбумина, альгината, целлюлозы и производных целлюлозы, коллагена, фибрин, желатина, гиалуроновой кислоты,
- 10 олигосахаридов, гликаминогликанов, сульфатированных полисахаридов и их смесей и сополимеров. Предпочтительно, указанный ингредиент выбран из группы, состоящей из альбумина, сахарозы, трегалозы, лактита, желатина, гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрина, метоксиполиэтиленгликоля и полиэтиленгликоля.

В другом варианте настоящее изобретение относится к способу лечения

- 15 млекопитающего, включающему стадию введения указанному млекопитающему эффективного количества композиции, содержащей кристаллизованный DLL4-связывающий белок, кристаллизованную конструкцию антитела или кристаллизованный коньюгат белка (включая коньюгаты антитела), описанные выше.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции,

- 20 содержащей DLL4-связывающий белок, конструкцию антитела или коньюгат белка (включая коньюгаты антитела), описанные выше, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте изобретения фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один дополнительный агент. Указанным дополнительным агентом может быть терапевтическое средство, используемое для лечения расстройства,
- 25 ассоциированного с негативным воздействием DLL4. Предпочтительно, фармацевтическая композиция содержит дополнительный агент, выбранный из группы, состоящей из терапевтического средства, визуализирующего агента, противоопухолевого средства; химиотерапевтического средства (такого как ДНК-алкилирующий агент, цисплатин, карбоплатин, антитубулиновый агент, паклитаксел, доцетаксел,
- 30 доксорубицин, гемцитабин, гемзар, антрациклины, адриамицин, ингибитор топоизомеразы I, ингибитор топоизомеразы II, 5-фторурацил (5-FU), лейковорин, иринотекан) и ингибиторов тирозинкиназных рецепторов (например, эрлотиниба, гефитиниба), ингибитора COX-2 (например, целекоксиба), ингибитора киназы и ингибитора ангиогенеза (включая, но не ограничиваясь ими, анти-VEGF антитело или VEGF-ловушка); блокатора костимулирующей молекулы (включая, но не ограничиваясь ими, анти-B7.1 антитело, анти-B7.2 антитело, CTLA4-Ig, анти-CD20 антитело); блокатора адгезивной молекулы (включая, но не ограничиваясь ими, анти-LFA-1 антитело, антитело против E/L-селектина и ингибитор небольшой молекулы); антитела против цитокинов или его функционального фрагмента (включая, но не ограничиваясь ими, анти-IL-18 антитело, анти-TNF антитело и анти-IL-6 антитело/антитело против рецептора цитокина), метотрексата, циклоспорина, рапамицина, FK506, детектируемой метки или репортера, антагониста TNF, противоревматического средства, мышечного релаксанта, наркотического средства, нестероидного противовоспалительного средства (НСПВС), аналгетика, анестетика, седативного средства, местного анестетика, нейромышечного
- 40 блокатора, противомикробного средства, средства против псориаза, кортикостероида, анаболического стeroида, эритропоэтина, иммунизирующего средства, иммуноглобулина, иммунодепрессанта, гормона роста, лекарственного средства для гормон-заместительной терапии, радиофармацевтического средства, антидепрессанта,
- 45 блокатора, противомикробного средства, средства против псориаза, кортикостероида, анаболического стeroида, эритропоэтина, иммунизирующего средства, иммуноглобулина, иммунодепрессанта, гормона роста, лекарственного средства для гормон-заместительной терапии, радиофармацевтического средства, антидепрессанта,

антипсихотического средства, стимулятора, противоастматического лекарственного средства, бета-агониста, стероида, вводимого путем ингаляции, эpineфрина или его аналога, цитокина и антагониста цитокина.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибиования

- 5 активности человеческого DLL4, включающему контактирование человеческого DLL4 с описанным выше связывающим белком в целях ингибиования или нейтрализации человеческого DLL4. В своем родственном аспекте, настоящее изобретение относится к способу ингибиования активности DLL4 у человека, страдающего расстройством, ассоциированным с негативным воздействием DLL4, где указанный способ включает
- 10 введение указанному человеку вышеописанного связывающего белка в целях ингибиования человеческого DLL4 у человека и лечения указанного пациента, страдающего данным расстройством. Указанное расстройство предпочтительно выбрано из группы, включающей первичный и метастатический рак, включая карциномы молочной железы, толстой кишки, прямой кишки, легких, ротовоглотки, гортани,
- 15 пищевода, желудка, поджелудочной железы, печени, желчного пузыря и желчных протоков, тонкой кишки, мочевых путей (включая почки, мочевой пузырь и уретелий), женских половых органов (включая шейку матки, матку и яичники, а также хориокарциномы и трофобластоз у беременных), мужских половых органов (включая предстательную железу, семенные пузырьки, яички и эмбрионально-клеточные опухоли),
- 20 эндокринных желез (включая щитовидную железу, кору надпочечника и гипофиз) и кожи, а также гемангиомы, меланомы, саркомы (включая саркомы костей и мягких тканей, а также саркому Капоши), опухоли головного мозга, нервных тканей, глаз и мозговой оболочки (включая астроцитомы, глиомы, глиобластомы, ретинобластомы, невромы, нейробластомы, шванномы и менингиомы), солидные опухоли, происходящие
- 25 от гемопоэтических злокачественных опухолей, такие как лейкоз и лимфомы (ходжкинская и неходжкинская лимфомы), метастазы опухоли, глазную неоваскуляризацию (включая слепоту при диабете, ретинопатию, возрастную дегенерацию желтого пятна и покраснение), отеки, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, атеросклеротические бляшки, болезнь Крона, воспалительное заболевание
- 30 кишечника, асцит, трудно поддающийся лечению, псориаз, саркоидоз, артериосклероз, сепсис, пептические язвы, ожоги, панкреатит, поликистоз яичника (ПКЯ), эндометриоз, фиброму матки, злокачественную гипертрофию предстательной железы и другие ассоциированные и неассоциированные с ангиогенезом заболевания, характеризующиеся абберантной активностью DLL4.

- 35 В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего расстройством, ассоциированным с негативным воздействием человеческого DLL4, где указанный способ включает стадию введения любого из описанных выше связывающих белков до, во время или после введения второго агента, описанного выше. В предпочтительном варианте изобретения указанный второй агент
- 40 выбран из группы, состоящей из: средства для лучевой терапии; противоопухолевого средства; химиотерапевтического средства (такого как ДНК-алкилирующий агент, цисплатин, карбоплатин, антитубулиновый агент, паклитаксел, доцетаксел, таксол, доксорубицин, гемцитабин, гемзар, антрациклины, адриамицины, ингибитор топоизомеразы I, ингибитор топоизомеразы II, 5-фторурацил (5-FU), лейковорин, иринотекан) и
- 45 ингибиторов тирозинкиназных рецепторов (например, эрлотиниба, гефитиниба), ингибитора COX-2 (например, целекоксиба), ингибитора киназы и ингибитора ангиогенеза (включая, но не ограничиваясь ими, анти-VEGF антитело или VEGF-ловушка); блокатора костимулирующей молекулы (включая, но не ограничиваясь ими,

анти-B7.1 антитело, анти-B7.2 антитело, CTLA4-Ig, анти-CD20 антитело), блокатора адгезивной молекулы (включая, но не ограничиваясь ими, анти-LFA-1 антитело, антитело против Е/L-селектина и ингибитор небольшой молекулы); антитела против цитокинов или его функционального фрагмента (включая, но не ограничиваясь ими, анти-IL-18 5 антитело, анти-TNF антитело и анти-IL-6 антитело/антитело против рецептора цитокина), метотрексата, циклоспорина, рапамицина, FK506, детектируемой метки или репортера, антагониста TNF, противоревматического средства, мышечного релаксанта, наркотического средства, нестероидного противовоспалительного средства (НСПВС), 10 аналгетика, анестетика, седативного средства, местного анестетика, нейромышечного блокатора, противомикробного средства, средства против псориаза, кортикоステроида, анаболического стероида, эритропоэтина, иммунизирующего средства, иммуноглобулина, иммунодепрессанта, гормона роста, лекарственного средства для 15 гормон-заместительной терапии, радиофармацевтического средства, антидепрессанта, антипсихотического средства, стимулятора, противоастматического лекарственного средства, бета-агониста, стероида, вводимого путем ингаляции, эpineфрина или его аналога, цитокина и антагониста цитокина.

В предпочтительном варианте изобретения вышеописанные здесь фармацевтические композиции вводят индивидууму по меньшей мере одним способом, выбранным из группы, состоящей из парентерального введения, под кожного введения, 20 внутримышечного введения, внутривенного введения, внутрисуставного введения, внутрибронхиального введения, внутрибрюшинного введения, интракапсулярного введения, внутрихрящевого введения, внутриполостного введения, внутричревного введения, внутримозжечкового введения, интрацеребровентрикулярного введения, введения в толстую кишку, интраэрвикального введения, внутрижелудочного введения, 25 введения в печень, введения в миокард, внутрикостного введения, внутритазового введения, введения в перикард, интраперитониального введения, интраплеврального введения, введения в предстательную железу, интрапульмонарного введения, интракретального введения, внутрипочечного введения, введения в сетчатку глаза, интраспинального введения, введения в синовиальную жидкость, введения в грудную 30 клетку, внутриматочного введения, интравезикулярного введения, введения в виде болюса, вагинального введения, ректального введения, трансбуккального введения, подъязычного введения, интраназального введения и чрескожного введения.

В другом аспекте настоящее изобретение относится по меньшей мере к одному антиидиотипическому анти-DLL4 антителу против по меньшей мере одного DLL4-35 связывающего белка согласно изобретению. Таким антиидиотипическим антителом является любая белок- или пептид-содержащая молекула, включающая по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, такую как, но не ограничивающуюся ими, по меньшей мере одна гипервариабельная область (комплементарность-определяющая область (CDR)) тяжелой или легкой цепи или ее лиганд-связывающая часть, вариабельная 40 область тяжелой цепи или легкой цепи, константная область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасная область или любая их часть, которые могут быть включены в связывающий белок согласно изобретению.

Любой из ряда форматов иммунодетектирующих анализов может быть адаптирован для использования DLL4-связывающего белка согласно изобретению в целях 45 детектирования DLL4 в смеси, в растворе или в биологическом образце. Такими форматами иммунодетектирующих анализов являются, но не ограничиваются ими, радиоиммуноанализ (РИА), иммунопреципитация, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммуноблот-анализ (например, вестерн-блот-анализ),

имммунологические полоски (например, индикаторные тест-полоски), содержащие DLL4-связывающий белок согласно изобретению, адсорбированный или иммобилизованный на субстрате, FACS и т.п. Детектирование DLL4 с использованием DLL4-связывающего белка согласно изобретению может быть проведено *in vitro* в смеси, в растворе или в биологическом образце. Биологическими образцами, которые могут быть подвергнуты контактированию со связывающим белком согласно изобретению для детектирования DLL4 или для измерения его уровня в образце, являются, но не ограничиваются ими, моча, слюна, мазок из ротовой полости (щечный мазок, мазок с языка или из зева), кожный мазок, соскоб с кожи, мазок из прямой кишки, влагалищный мазок, проба цельной крови, проба плазмы, проба сыворотки, биоптат ткани и любой другой образец, взятый у индивидуума в соответствии с процедурой, известной специалистам. В другом варианте изобретения DLL4-связывающий белок может быть использован для детектирования DLL4 *in vivo* различными методами томографии и сканирования, включая, но не ограничиваясь ими, рентгеновскую компьютерную томографию (КТ), магнитно-резонансную томографию (МРТ) и позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ).

#### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение относится к DLL4-связывающим белкам, а в частности, к анти-DLL4 антителам или к их антигенсвязывающим частям, которые связываются с DLL4. В различных аспектах настоящее изобретение относится к антителам и фрагментам антител и фармацевтическим композициям, содержащим такие антитела и фрагменты, а также к нуклеиновым кислотам, рекомбинантным экспрессионным векторам и к клеткам-хозяевам, используемым для получения таких антител и фрагментов. В объем настоящего изобретения входят также способы применения антител согласно изобретению для детектирования человеческого DLL4 или мышного DLL4, способы ингибирования активности человеческого или мышного DLL4 и/или человеческого или мышного VEGFR2 или VEGFR1, *in vitro* или *in vivo*, и способы регуляции экспрессии генов.

Если это не оговорено особо, то все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют значения, в основном, понятные среднему специалисту в области, к которой относится изобретение. Значения и объем терминов должны быть понятны специалистам в данной области, однако, в случае возникновения каких-либо скрытых разнотечений, следует отдать предпочтение определениям, данным в настоящей заявке, а не тем определениям, которые приводятся в словарях или в других источниках.

Кроме того, если это не противоречит контексту настоящего описания, то существительные, употребляемые в единственном числе, могут означать и существительные во множественном числе, и наоборот. В настоящей заявке, употребление слова «или» означает «и/или», если это не оговорено особо. Кроме того, термин «включающий», а также другие его формы, такие как «включать» или «включенный», являются неограничивающими. Такие термины, как «элемент» или «компонент» охватывают как элементы, так и компоненты, включающие одну единицу и элементы и компоненты, которые включают более чем одну субъединицу, если это не оговорено особо.

В общих чертах, номенклатура и способы, относящиеся к клеткам, к тканевым культурам, к молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетике, химии белков и нуклеиновых кислот и к гибридизации описанных здесь белков и нуклеиновых кислот, хорошо известны специалистам и широко применяются в данной области. Настоящее изобретение обычно осуществляют стандартными методами и способами,

хорошо известными специалистам и описанными в различных общих руководствах и в специальной научной литературе, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании, если это не указано особо. Ферментативные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителей, обычно рекомендуемыми 5 специалистам или предложенными в настоящей заявке. Используемая номенклатура и лабораторные процедуры, а также методы аналитической химии, химии органического синтеза и медицинской фармацевтической химии, описанные в настоящей заявке, хорошо известны и широко применяются специалистами. Для химических синтезов, химических 10 анализов, фармацевтических составов, составов доставки и для лечения пациентов применяются стандартные методы.

Для лучшего понимания настоящего изобретения ниже приводится определение отдельных терминов.

Используемый здесь термин «полипептид» означает любую полимерную цепь из аминокислот. Термины «пептид» и «белок» являются синонимами термина 15 «полипептид», а также означают полимерную цепь из аминокислот. Термин «полипептид» охватывает нативные или искусственные белки, фрагменты белков и полипептидные аналоги последовательности белка. Полипептид может быть мономерным или полимерным. При употреблении термина «полипептид» подразумевается, что он включает полипептид и его фрагменты и варианты (включая 20 фрагменты вариантов), если это не противоречит контексту изобретения. Что касается антигенного полипептида, то фрагмент полипептида содержит, но необязательно, по меньшей мере один эпигоп с непрерывной цепью или нелинейный эпигоп полипептида. Точные границы по меньшей мере одного фрагмента эпигопа могут быть определены средним специалистом в данной области. Этот фрагмент содержит по меньшей мере 25 примерно 5 смежных аминокислот, например, по меньшей мере примерно 10 смежных аминокислот, по меньшей мере примерно 15 смежных аминокислот или по меньшей мере примерно 20 смежных аминокислот. Варианты полипептида описаны в настоящей заявке.

Термины «изолированный белок» или «изолированный полипептид» означают белок 30 или полипептид, которые, по своему происхождению или в своем источнике, не ассоциируются с природными компонентами, вместе с которыми они обычно присутствуют в своем природном состоянии; по существу, не содержат других белков, происходящих от одного и того же вида; экспрессируются клеткой другого вида, или не существуют в природе. Таким образом, полипептид, который синтезируется 35 химическими методами или синтезируется в клеточной системе, отличающейся от его природной клеточной системы, будет рассматриваться как полипептид, «изолированный» из его природного окружения. Белок может также, по существу, не содержать природных компонентов в результате его выделения методами очистки белка, хорошо известными специалистам.

Используемый здесь термин «выделение» означает способ получения химических 40 молекул, таких как полипептид, который, по существу, не содержит природных компонентов в результате его выделения, например, методами очистки белка, хорошо известными специалистам.

Используемый здесь термин «человеческий DLL4» (сокращенно обозначаемый здесь 45 «hDLL4» или «huDLL4») включает несколько EGF-подобных доменов и домен DSL, необходимые для связывания с рецептором. Этот термин включает белок размером примерно 74-75 кДа. Структура и выведенные последовательности ДНК и последовательности белка человеческого DLL4 более подробно описаны, например,

Shutter et al., *Genes & Dev.*, 4: 1313-1318 (2000). Используемый здесь термин «человеческий DLL4» также включает рекомбинантный человеческий DLL4 (rhDLL4), который может быть получен стандартными рекомбинантными методами экспрессии.

Используемый здесь термин «биологическая активность», если он относится к DLL4,

5 означает все биологические свойства, присущие DLL4. Биологическими свойствами DLL4 являются, но не ограничиваются ими, связывание с рецептором Notch, активация рецептора Notch, ингибирование передачи сигнала VEGF, подавление VEGFR2 и индуцирование VEGFR1.

Используемые здесь термины «специфическое связывание» или «специфически

10 связывающий», если они относятся к взаимодействию антитела, белка или пептида со второй химической молекулой, означают, что такое взаимодействие зависит от присутствия конкретной структуры (например, антигенных детерминанты или эпитопа) на химической молекуле, так, например, антитело распознает специфическую белковую структуру, а не белки в целом, и связывается с этой структурой. Если антитело является 15 специфичным к эпитопу «A», то присутствие молекулы, содержащей эпитоп А (или свободный немеченый А), в реакционной смеси, включающей меченный «A» и антитело, будет приводить к снижению количества меченого А, связанного с антителом.

Используемый здесь термин «антитело», в своем широком смысле, означает любую молекулу иммуноглобулина (Ig), состоящую из четырех полипептидных цепей, двух

20 тяжелых цепей (H) и двух легких цепей (L), или любые их функциональные фрагменты, мутанты, варианты или производные, сохраняющие основные эпитоп-связывающие свойства молекулы Ig. Такие типы мутантных, модифицированных или дериватизированных антител известны специалистам. Неограничивающие варианты таких антител обсуждаются ниже.

25 В полноразмерном антителе каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (обозначаемой здесь HCVR или VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (обозначаемой здесь LCVR 30 или VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области VH и VL могут быть также подразделены на

гипервариабельные области, называемые комплементарность- определяющими областями (CDR), которые чередуются с областями, являющимися более консервативными и называющимися каркасными областями (FR). Каждая VH и VL 35 состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных в направлении от амино-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Молекулами иммуноглобулина могут быть молекулы любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса.

Термин «Fc-область» используется для определения С-концевой области тяжелой

40 цепи иммуноглобулина, которая может быть получена путем гидролиза интактного антитела папаином. Fc-областью может быть Fc-область нативной последовательности или Fc-область ее варианта. Fc-область иммуноглобулина обычно содержит два константных домена, домен CH2 и домен CH3, и включает, но необязательно, домен CH4. Замены аминокислотных остатков в Fc-части, вводимые для изменения

45 эффекторной функции антитела, известны специалистам (патенты США №№ 5648260 и 5624821). Fc-часть антитела опосредует несколько важных эффекторных функций, например, индуцирование цитокинов, ADCC, фагоцитоз, комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), время полужизни/скорость клиренса антитела и образование

комплексов антиген-антитело. В некоторых случаях желательно, чтобы терапевтическое антитело обладало этими эффекторными функциями, но в других случаях, в зависимости от терапевтического применения, такие функции могут необязательными или даже нежелательными. Некоторые изотипы человеческих IgG, а в частности, IgG1 и IgG3,

5 опосредуют ADCC и CDC посредством связывания с Fc<sub>y</sub>R и с комплементом C1q, соответственно. Fc-рецепторы у новорожденных (FcRn) представляют собой важные компоненты, определяющие время полужизни антител в кровотоке. В другом варианте изобретения по меньшей мере один аминокислотный остаток в константной области антитела, например, в Fc-области антитела, заменяют так, чтобы это приводило к изменению эффекторных функций антитела. Димеризация двух идентичных тяжелых цепей иммуноглобулина опосредуется димеризацией доменов CH3 и стабилизируется дисульфидными связями в шарнирной области (Huber et al. *Nature*; 264: 415-420 (1976); Thies et al., *J. Mol. Biol.*; 293: 67-79 (1999)). Мутация цистeinовых остатков в шарнирных областях, проводимая в целях предотвращения образования дисульфидных связей

10 между тяжелыми цепями, будет дестабилизировать димеризацию доменов CH3. Были идентифицированы остатки, ответственные за димеризацию CH3 (Dall'Acqua *Biochem.* 37: 9266-9273 (1998)). Поэтому это дает возможность получить одновалентную половину Ig. Интересно отметить, что такие одновалентные молекулы, составляющие половину Ig, были обнаружены в природе для иммуноглобулинов подклассов IgG и IgA (Seligman,

15 *Ann. Immunol.* 129: 855-70 (1978); Biewenga et al. *Clin Exp Immunol* 51:395-400 (1983)). Стхиометрия Fc-области FcRn:Ig, как было определено, составляет 2:1 (West et al. *Biochem.* 39: 9698-9708 (2000)), и половина Fc является достаточной для опосредования связывания с FcRn (Kim et al. *Eur. J. Immunol.*; 24: 542-548 (1994)). Мутации, вводимые для нарушения димеризации домена CH3, больше не смогут негативно влиять на связывание с FcRn, поскольку остатки, играющие важную роль в димеризации CH3, расположены на внутренней поверхности β-складчатой структуры CH3, а область, ответственная за связывание с FcRn, расположена за пределами границы доменов CH2-CH3. Однако половина молекул Ig может иметь определенное преимущество с точки зрения проникновения в ткань, что обусловлено ее меньшим размером по сравнению

20 с обычным антителом. В одном из вариантов изобретения по меньшей мере один аминокислотный остаток в константной области связывающего белка согласно изобретению, например, в Fc-области, заменяют так, чтобы это приводило к изменению димеризации тяжелых цепей и к образованию половинных молекул Ig.

25 Противовоспалительная активность IgG полностью зависит от сиалирирования N- связанного гликана Fc-фрагмента IgG. Было определено, что присутствие гликана является обязательным условием для сообщения противовоспалительной активности, поскольку его присутствие позволяет создать соответствующий Fc-фрагмент IgG1 и, тем самым, получить полностью рекомбинантный сиалирированный Fc-фрагмент IgG1 со значительно более высокой активностью (Anthony, et al. *Science* 320: 373-376 (2008)).

30 40 Используемый здесь термин «антигенсвязывающая часть» антитела (или просто «часть антитела») означает один или несколько фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (то есть, с конкретным эпитопом антигена, таким как эпитоп DLL4). Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть реализована благодаря фрагментам полноразмерного

35 45 антитела. Такие варианты антител могут быть также биспецифическими, иметь «двойную» специфичность или быть мультиспецифическими, то есть специфически связываться с двумя или более различными антигенами (или с двумя или более различными эпитопами на одном и том же антигене). Примерами связывающихся

фрагментов, входящих в объем термина «антигенсвязывающая часть» антитела, являются (i) Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii)  $F(ab')_2$ -фрагмент, двухвалентный фрагмент, включающий два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одной плечи антитела; (v) dAb-фрагмент (Ward et al., *Nature* 341: 544-546 (1989); публикация PCT WO 90/05144A1), который содержит один вариабельный домен; и (vi) изолированная гипервариабельная область (CDR). Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, однако, они могут быть 5 присоединены друг к другу рекомбинантными методами посредством синтетического линкера, который позволяет создать одну белковую цепь, где области VL и VH спариваются, образуя одновалентные молекулы (известные как одноцепочечный Fv (scFv); см. например, Bird et al. *Science* 242: 423-426 (1988); и Huston et al. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85: 5879-5883 (1988)). Такие одноцепочечные антитела также входят в объем 10 термина «антигенсвязывающая часть» антитела. В объем этого термина также входят и другие формы одноцепочечных антител, таких как диантитела. Диантитела представляют собой двухвалентные биспецифические антитела, в которых домены VH и VL экспрессируются на одной полипептидной цепи, но соединены посредством линкера, который является слишком коротким для образования пары между двумя 15 доменами на одной и той же цепи, а поэтому домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и образовывать два антигенсвязывающих сайта (см., например, Holliger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90: 6444-6448 (1993); Poljak, R.J., *Structure* 2:1121-1123 (1994)). Такие антигенсвязывающие части антитела известны специалистам (Kontermann & Dubel eds., *Antibody Engineering* (Springer-Verlag. New York, 2001) р. 790 (ISBN 3-540-41354-5). Кроме того, одноцепочечными антителами также 20 являются «линейные антитела», содержащие пару tandemных Fv-сегментов (VH-CH1-VH-CH1), которые, вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи, образуют пару антигенсвязывающих областей (Zapata et al. *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 (1995); и патент США № 5641870).

Используемый здесь термин «конструкция антитела» (или «конструкция анти-DLL4 антитела») означает полипептид, содержащий одну или несколько антигенсвязывающих частей согласно изобретению, связанных с линкерным полипептидом или с константным доменом иммуноглобулина. Линкерные полипептиды содержат два или более 30 аминокислотных остатков, связанных пептидными связями, и используются для связывания с одной или несколькими антигенсвязывающими частями. Такие линкерные полипептиды хорошо известны специалистам (см., например, Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993); Poljak, RJ., *Structure*, 2: 1121-1123 (1994)). Термин «константный домен иммуноглобулина» означает константный домен тяжелой или 35 легкой цепи. Аминокислотные последовательности константного домена тяжелой и легкой цепей человеческого IgG известны специалистам и представлены в таблице 1.

Таблица 1 Последовательность константного домена тяжелой цепи человеческого IgG и константного домена легкой цепи человеческого IgG		
Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
		12345678901234567890123456789012

	Константная область Ig-гамма 1	SEQ ID NO: 2	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTWSNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPAVEVTCVVVDVSHEDEPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAG 12345678901234567890123456789012
5			QPREPQVTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
10			ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTWSNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPCPAPEAAGGSPVFLFPP KPKDTLMISRTPAVEVTCVVVDVSHEDEPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAG QPREPQVTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
15	Мутантная константная область Ig-гамма 1	SEQ ID NO: 3	ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTWSNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPCPAPEAAGGSPVFLFPP KPKDTLMISRTPAVEVTCVVVDVSHEDEPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAG QPREPQVTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
20	Константная область Ig каппа	SEQ ID NO: 4	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
25	Константная область Ig лямбда	SEQ ID NO: 5	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

Кроме того, антитело или его антигенсвязывающая часть могут быть частью более крупных иммуноадгезивных молекул, образованных посредством ковалентного или нековалентного связывания данного антитела или его антигенсвязывающей части с одним или несколькими другими белками или пептидами. Примерами таких иммуноадгезивных молекул являются коровая область стрептавидина, используемая для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov et al., *Human Antibodies and Hybridomas*, 6: 93-101 (1995)), цистеиновый остаток, маркерный пептид и С-концевая полипептидная метка, используемые для получения двухвалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov et al., *Mol. Immunol.*, 31: 1047-1058 (1994)). Части антител, такие как Fab- и F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, могут быть получены из целых антител стандартными методами, такими как гидролиз целых антител папаином или пепсином, соответственно. Кроме того, антитела, части антител и иммуноадгезивные молекулы могут быть получены стандартными методами рекомбинантных ДНК, описанными в настоящей заявке и известными в данной области техники.

Используемый здесь термин «изолированное антитело» означает антитело, которое, по существу, не содержит другие антитела, обладающие различными специфичностями к антигену (например, изолированное антитело, которое специфически связывается с hDLL4, в основном, изолировано от антител, которые специфически связываются с антигенами, не являющимися hDLL4). Однако изолированное антитело, которое специфически связывается с hDLL4, может перекрестно реагировать с другими антигенами, такими как молекулы DLL4, происходящие от других видов (например, muDLL4). Кроме того, изолированное антитело может быть, в основном, отделено от

другого клеточного материала и/или других химических веществ.

Используемый здесь термин «моноклональное антитело» или сокращенно «Mab» и «mAb» означает антитело, полученное от популяции, в основном, гомогенных антител, то есть отдельных антител, составляющих данную популяцию, которые являются

- 5 идентичными за исключением антител с возможными природными мутациями, которые могут присутствовать в небольших количествах. Моноклональные антитела являются в высокой степени специфичными и направлены против одного антигена. Кроме того, в отличие от составов поликлональных антител, которые обычно включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое mAb
- 10 направлено против одной детерминанты на антигене. Определение «моноклональный» не означает, что данное антитело должно быть продуцировано каким-либо конкретным методом.

Используемый здесь термин «человеческое антитело» включает антитела, имеющие вариабельные и константные области, происходящие от последовательностей

- 15 иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие антитела согласно изобретению могут включать аминокислотные остатки, не принадлежащие последовательностям иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (например, в них могут быть введены мутации посредством неспецифического или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*),
- 20 например, такие остатки могут присутствовать в CDR, а в частности, в CDR3. Однако используемый здесь термин «человеческое антитело» не включает антитела, в которых последовательности CDR, происходящие от зародышевой линии млекопитающих других видов, таких как мышь, были присоединены к человеческим каркасным последовательностям.

- 25 Используемый здесь термин «рекомбинантное человеческое антитело» включает все человеческие антитела, которые были получены, экспрессированы, сконструированы или выделены рекомбинантными методами, например, антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфицированного в клетку-хозяина, антитела, выделенные из библиотек рекомбинантных комбинаторных
- 30 человеческих антител (Hoogenboom, *Trends Biotechnol.* 15: 62-70(1997); Azzazy & Highsmith *Clin. Biochem.* 35: 425-445(2002); Gavilondo & Larrick *BioTechniques* 29: 128-145 (2002); Hoogenboom & Chames, *Immunol. Today* 21: 371-378 (2000)), антитела, выделенные у животных (например, мышей), которые являются трансгенными по отношению к генам человеческого иммуноглобулина (см., Taylor et al. *Nucl. Acids Res.* 20: 6287-6295 (1992);
- 35 Kellermann & Green, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 593-597 (2002); Little et al. *Immunol. Today* 21: 364-370 (2000)), или антитела, которые были получены, экспрессированы, сконструированы или выделены другими методами, включающими сплайсинг последовательностей генов человеческого иммуноглобулина с образованием других последовательностей ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют
- 40 вариабельные и константные области, происходящие от последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Однако, в некоторых вариантах изобретения, такие рекомбинантные человеческие антитела подвергают мутагенезу *in vitro* (или, если используется животное, которое является трансгенным по отношению к последовательности человеческого Ig, его подвергают соматическому мутагенезу *in vivo*), и таким образом, аминокислотные последовательности областей VH и VL
- 45 рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, если они происходят от последовательностей VH и VL человеческой зародышевой линии и являются родственными этим последовательностям, обычно не входят в репертуар

человеческих антител зародышевой линии *in vivo*.

Термин «химерное антитело» означает антитела, которые содержат последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей, происходящие от одного вида, и последовательности константной области, происходящие от других видов, такие как антитела, имеющие мышиные вариабельные области тяжелой и легкой цепей, присоединенные к человеческим константным областям.

Используемый здесь термин «CDR» означает гипервариабельную область в вариабельных последовательностях антитела. В каждой из вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи присутствуют три CDR, которые, для каждой вариабельной области, обозначаются CDR1, CDR2 и CDR3. Используемый здесь термин «набор CDR» означает группу из трех CDR, которые присутствуют в одной вариабельной области, обладающей способностью связываться с антигеном. Точные границы этих CDR были определены различным образом в зависимости от различных систем. Система, описанная Кэбатом (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) и (1991)), имеет не только однозначную систему нумерации остатков, применяемую к любой вариабельной области антитела, но также и точные границы остатков, определяющие три CDR. Эти CDR могут называться «CDR по Кэбату». Чотия и сотрудники (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987) и Chothia et al., *Nature* 342: 877-883 (1989)) обнаружили, что некоторые сублокации в CDR по Кэбату приобретают почти идентичную конформацию пептидного остова, несмотря на то, что они имеют значительные различия на уровне аминокислотной последовательности. Такие подобласти были обозначены «L1», «L2» и «L3» или «H1», «H2» и «H3», где «L» и «H» означают области легкой и тяжелой цепи, соответственно. Такие области, которые имеют границы, перекрывающиеся с CDR по Кэбату, могут называться «CDR по Чотия». Другие границы, определяющие перекрывание CDR с CDR по Кэбату, были описаны в публикации Padlan, *FASEB J.* 9: 133-139 (1995) и MacCallum, *J. Mol. Biol.* 262(5): 732-45 (1996). Другие определения границ CDR могут, но не строго, соответствовать одной из описанных здесь систем, но тем не менее эти границы перекрываются с CDR по Кэбату, хотя эти области могут быть короче или длиннее, чем это было предсказано или получено из экспериментальных данных, которые указывают на то, что конкретные остатки или группы остатков или даже полноразмерные CDR не оказывают значительного влияния на связывание с антигеном. В описанных здесь способах могут использоваться CDR, определенные в соответствии с любой из этих систем, хотя в некоторых вариантах используются CDR, определенные по Кэбату или Чотия.

Используемые здесь термины «нумерация по Кэбату», «определение по Кэбату» и «мечение по Кэбату» являются синонимами. Эти термины, известные специалистам, означают систему нумерации аминокислотных остатков, которые являются более вариабельными (то есть, гипервариабельными), чем другие аминокислотные остатки в вариабельных областях тяжелой и легкой цепей антитела или его антигена связывающей части. (Kabat et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, 190: 382-391 (1971) and Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest. Fifth Edition*. U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)). Для вариабельной области тяжелой цепи (VH) гипервариабельная область простирается в пределах от аминокислотного положения 31 до аминокислотного положения 35 для CDR1, от аминокислотного положения 50 до аминокислотного положения 65 для CDR2, и от аминокислотного положения 95 до аминокислотного положения 102 для CDR3. Для вариабельной области легкой цепи (VL) гипервариабельная область простирается в пределах от аминокислотного

положения 24 до аминокислотного положения 34 для CDR1, от аминокислотного положения 50 до аминокислотного положения 56 для CDR2, и от аминокислотного положения 89 до аминокислотного положения 97 для CDR3.

За последние 20 лет наблюдается увеличение общедоступных баз данных и данных анализа имеющихся в них аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелых и легких цепей, что позволяет специалистам определить типичные пограничные области между каркасными областями (FR) и последовательностями CDR, присутствующими в последовательностях вариабельных областей, и точно идентифицировать CDR в соответствии с нумерацией по Кэбату, нумерацией по Чотиа или в соответствии с другими системами нумерации. См., например, Martin, «Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains», Kontermann and Dübel, eds., Antibody Engineering (Springer-Verlag, Berlin, 2001), глава 31, страницы 432-433. Ниже приводится подходящий метод определения аминокислотных последовательностей CDR по Кэбату, присутствующих в аминокислотных последовательностях вариабельных областей тяжелой цепи (VH) и легкой цепи (VL):

Идентификация аминокислотной последовательности CDR-L1:

Приблизительно первые 24 аминокислотных остатка от амино-конца области VL;

Остатком перед последовательностью CDR-L1 всегда является цистеин (C);

Остатком после последовательности CDR-L1 всегда является триптофан (W), обычно

Trp-Tyr-Gln (W-Y-Q), но также и Trp-Leu-Gln (W-L-Q), Trp-Phe-Gln (W-F-Q) и Trp-Tyr-Leu (W-Y-L);

Длина обычно составляет от 10 до 17 аминокислотных остатков.

Идентификация аминокислотной последовательности CDR-L2:

Всегда первые 16 остатков после CDR-L1;

Остатками перед последовательностью CDR-L2 обычно являются Ile-Tyr (I-Y), но также и Val-Tyr (V-Y), Ile-Lys (I-K) и Ile-Phe (I-F);

Длина всегда составляет 7 аминокислотных остатков.

Идентификация аминокислотной последовательности CDR-L3:

Всегда первые 33 аминокислоты после CDR-L2;

Остатком перед аминокислотной последовательностью CDR-L3 всегда является цистеин (C);

Остатками после последовательностями всегда являются Phe-Gly-X-Gly (F-G-X-G) (SEQ ID NO: 374), где X представляет собой любую аминокислоту;

Длина обычно составляет от 7 до 11 аминокислотных остатков.

Идентификация аминокислотной последовательности CDR-H1:

Приблизительно первые 33 аминокислотных остатка от амино-конца области VH и всегда 9 остатков после цистеина (C);

Остатками перед последовательностью всегда являются Cys-X-X-X-X-X-X-X (SEQ ID NO: 375), где X представляет собой любую аминокислоту;

Остатком после последовательности всегда является Trp (W), обычно Trp-Val (W-V), но также и Trp-Ile (W-I) и Trp-Ala (W-A);

Длина обычно составляет от 5 до 7 аминокислотных остатков.

Идентификация аминокислотной последовательности CDR-H2:

Всегда первые 15 аминокислотных остатков после CDR-H1;

Остатками перед последовательностью обычно являются Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (L-E-W-I-G) (SEQ ID NO: 376), но возможны также и другие варианты;

Остатками после последовательности являются Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala (K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A);

Длина обычно составляет от 16 до 19 аминокислотных остатков.

Идентификация аминокислотной последовательности CDR-H3:

Всегда первые 33 аминокислотных остатка после CDR-H2 и всегда 3 остатка после цистеина (C);

5 Остатками перед последовательностью всегда являются Cys-X-X(C-X-X), где X представляет собой любую аминокислоту, а обычно Cys-Ala-Arg (C-A-R);

Остатками после последовательности всегда являются Trp-Gly-X-Gly (W-G-X-G) (SEQ ID NO: 377), где X представляет собой любую аминокислоту;

Длина обычно составляет от 3 до 25 аминокислотных остатков.

10 Термин «CDR-привитое антитело» означает антитела, которые содержат последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей, которые происходят от одного вида, но в которых последовательности одной или нескольких CDR-областей VH и/или VL заменены последовательностями CDR других видов, например, такие антитела имеют мышиные вариабельные области тяжелой и легкой цепей, в которых 15 одна или несколько мышиных CDR (например, CDR3) были заменены человеческими последовательностями CDR.

Термин «гуманизированное антитело» означает антитела, которые содержат последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей, происходящие от млекопитающих, не являющихся человеком (например, мыши), но в которых по меньшей 20 мере часть последовательности VH и/или VL была модифицирована для сообщения ей большего сходства с последовательностью человеческого антитела, то есть большего сходства с вариабельными последовательностями человеческой зародышевой линии. «Гуманизированное антитело» представляет собой антитело или его вариант, производное, аналог или фрагмент, которые иммunoспецифически связываются с

25 представляющим интерес антигеном и содержат каркасную область (FR), имеющую, в основном, аминокислотную последовательность человеческого антитела и гипервариабельную область (CDR), имеющую, в основном, аминокислотную последовательность нечеловеческого антитела. Используемый здесь термин «в основном», относящийся к CDR, означает, что CDR имеет аминокислотную

30 последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности CDR нечеловеческого антитела. Гуманизированное антитело включает в основном все или по меньшей мере один, а обычно два вариабельных домена (Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, FabC, Fv), в которых все

35 или в основном все области CDR соответствуют нечеловеческому иммуноглобулину (то есть, донорному антителу), а все или в основном все каркасные области представляют собой области, имеющие консенсусную последовательность человеческого иммуноглобулина. В одном из вариантов изобретения гуманизированное антитело также содержит по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc),

40 а обычно человеческого иммуноглобулина. В некоторых вариантах изобретения гуманизированное антитело содержит легкую цепь, а также по меньшей мере вариабельный домен тяжелой цепи. Такое антитело также может включать области CH1, шарнирную область и области CH2, CH3 и CH4 тяжелой цепи. В некоторых вариантах изобретения гуманизированное антитело содержит только гуманизированную легкую цепь. В некоторых вариантах изобретения гуманизированное антитело содержит только гуманизированную тяжелую цепь. В конкретных вариантах изобретения гуманизированное антитело содержит только гуманизированный вариабельный домен легкой цепи и/или гуманизированную тяжелую цепь.

Гуманизированное антитело может быть выбрано из иммуноглобулинов любого класса, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая, но не ограничиваясь ими, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Гуманизированное антитело может содержать последовательности, происходящие от антител более чем одного класса или изотипа, а конкретные константные домены могут быть выбраны для оптимизации нужных эффекторных функций методами, хорошо известными специалистам.

Каркасные области и CDR гуманизированного антитела необязательно должны точно соответствовать родительским последовательностям, так, например, CDR донорного антитела или консенсусная каркасная область могут быть подвергнуты

5 мутагенезу путем замены, инсерции и/или делеции по меньшей мере одного аминокислотного остатка так, чтобы CDR или каркасный остаток в этом сайте не соответствовал остатку донорного антитела или консенсусной каркасной области. Однако, в предпочтительном варианте изобретения, такие мутации не должны быть избыточными. Обычно остатки гуманизированного антитела по меньшей мере на 80%,  
10 предпочтительно, по меньшей мере на 85%, более предпочтительно, по меньшей мере на 90%, а наиболее предпочтительно, по меньшей мере на 95% соответствуют остаткам последовательностей родительских FR и CDR. Используемый здесь термин «консенсусная каркасная область» означает каркасную область в консенсусной последовательности иммуноглобулина. Используемый здесь термин «консенсусная последовательность  
15 иммуноглобулина» означает последовательность, происходящую от наиболее часто встречающихся аминокислот (или нуклеотидов) в семействе родственных последовательностей иммуноглобулина (см., например, Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987)). «Консенсусная последовательность иммуноглобулина» может также содержать «консенсусную(ые) каркасную(ые) область  
20 (и)» и/или «консенсусную(ые) CDR». В семействе иммуноглобулинов каждое положение в консенсусной последовательности занято аминокислотой, наиболее часто встречающейся в этом положении указанного семейства. Если две аминокислоты встречаются с одинаковой частотой, то в консенсусной последовательности может присутствовать любая из этих аминокислот.

25 30 «Аффинно зрелым» антителом является антитело, имеющее одну или несколько модификаций в одной или нескольких CDR, которые приводят к повышению аффинности антитела к антигену-мишени, в отличие от родительского антитела, не имеющего такой (их) модификации(й). Репрезентативные аффинно зрелые антитела обладают наномолярной или даже пикомолярной аффинностью по отношению к антигену-мишени.

35 Аффинно зрелые антитела получают различными методами, известными специалистам. В публикации Marks et al., *BioTechnology*, 10: 779-783 (1992) описано аффинное созревание, достигаемое посредством перестановки доменов VH и VL. Неспецифический мутагенез CDR и/или каркасных остатков описан в публикациях: Barbas et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91: 3809-3813 (1994); Schier et al., *Gene*, 169: 147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.*, 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.*, 154(7): 3310-3319 (1995); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992). Селективная мутация в селективных положениях мутагенеза и контактирование или гипермутация с заменой аминокислотным остатком, повышающим активность, описана в патенте США US6914128B1.

40 Термин «поливалентный связывающий белок» означает связывающий белок, содержащий два или более антигенсвязывающих сайтов (также называемых здесь «антителенсвязывающими доменами»). Поливалентный связывающий белок предпочтительно конструируют так, чтобы он содержал три или более антигенсвязывающих сайта и, по существу, не являлся природным антителом. Термин

«мультиспецифический связывающий белок» означает связывающий белок, который способен связываться с двумя или более родственными или неродственными мишениями, включая связывающий белок, который способен связываться с двумя или более различными эпитопами одной и той же молекулы-мишени.

- 5 Используемый здесь термин «биспецифическое антитело» означает полноразмерные антитела, которые получают с применением квадромной технологии (см. Milstein et al., *Nature*, 305(5934): 537-540 (1983)), химического конъюгирования двух различных моноклональных антител (см., Staerz et al., *Nature*, 314(6012): 628-631 (1985)) или с применением технологии «узлы в дырках» или аналогичных технологий, которые
- 10 позволяют вводить мутации в Fc-область (см. Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(14): 6444-6448 (1993)), что приводит к получению множества различных молекул иммуноглобулина, из которых только одна молекула является функциональным биспецифическим антителом. Благодаря своей молекулярной функции, биспецифическое антитело связывается с одним антигеном (или эпитопом) на одной из двух
- 15 связывающихся ветвей (одна пара HC/LC), и с другим антигеном (или эпитопом) на второй ветви (другая пара HC/LC). Согласно такому определению, биспецифическое антитело имеет две отдельных антигенсвязывающих ветви (отличающихся по специфичности и по последовательностям CDR) и является одновалентным для каждого антигена, с которым оно связывается.
- 20 Используемый здесь термин «антитело с двойной специфичностью» означает полноразмерные антитела, которые могут связываться с двумя различными антигенами (или эпитопами) в каждой из своих двух связывающихся ветвей (пара HC/LC) (см. публикацию заявки PCT WO 02/02773). В соответствии с этим, связывающий белок с двойной специфичностью имеет две идентичных антигенсвязывающихся ветви с
- 25 идентичными специфичностями и идентичными последовательностями CDR и является двухвалентным для каждого антигена, с которым он связывается.

Связывающиеся белки «с двумя вариабельными доменами» («DVD») согласно изобретению содержат два или более антигенсвязывающих сайта и могут представлять собой двухвалентные связывающиеся белки (с двумя антигенсвязывающими сайтами),

- 30 четырехвалентные связывающиеся белки (с четырьмя антигенсвязывающими сайтами) или поливалентные связывающиеся белки. DVD могут быть моноспецифическими, то есть они могут связываться с одним антигеном (или с одним специфическим эпитопом), или мультиспецифическими, то есть они могут связываться с двумя или более антигенами (то есть, с двумя или более эпитопами одной и той же молекулы антигена-мишени или
- 35 с двумя или более эпитопами различных антигенов-мишеней). Предпочтительный связывающий DVD-белок содержит два DVD-полипептида тяжелой цепи и два DVD-полипептида легкой цепи и называется «DVD-иммуноглобулином» или «DVD-Ig». Поэтому такой связывающий белок DVD-Ig является тетramerным и напоминает молекулу IgG, но имеет большее количество антигенсвязывающих сайтов, чем молекула
- 40 IgG. Таким образом, каждая половина тетрамерной молекулы DVD-Ig напоминает одну половину молекулы IgG и включает DVD-полипептид тяжелой цепи и DVD-полипептид легкой цепи, но в отличие от пары тяжелой и легкой цепей молекулы IgG, которая имеет один антигенсвязывающий домен, пара тяжелой и легкой цепей молекулы DVD-Ig имеет два или более антигенсвязывающих сайтов.

45 Каждый антигенсвязывающий сайт связывающего белка DVD-Ig происходит от донорного («родительского») моноклонального антитела, а поэтому содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где общее число CDR, участвующих в связывании с антигеном, в каждом

антигенсвязывающем сайте равно шести. В соответствии с этим, связывающий белок DVD-Ig, который связывается с двумя различными эпитопами (то есть, с двумя различными эпитопами двух различных молекул антигенов или с двумя различными эпитопами одной и той же молекулы антигена), содержит антигенсвязывающий сайт, 5 происходящий от первого родительского моноклонального антитела, и антигенсвязывающий сайт, происходящий от второго родительского моноклонального антитела.

Описание конструирования и экспрессии, а также характеризация связывающихся молекул DVD-Ig приводится в публикации заявки РСТ № WO 2007/024715, в патенте

10 США № 7612181 и в публикации Wu et al., *Nature Biotech.*, 25: 1290-1297 (2007).

Предпочтительным примером таких молекул DVD-Ig являются молекулы, которые содержат тяжелую цепь, имеющую структурную формулу VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, где VD1 представляет собой первый вариабельный домен тяжелой цепи, VD2 представляет собой второй вариабельный домен тяжелой цепи, С представляет собой константный

15 домен тяжелой цепи, X1 представляет собой линкер, при условии, что он не является CH1, X2 представляет собой Fc-область, а *n* равно 0 или 1, а предпочтительно 1; и легкую цепь, имеющую структурную формулу VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, где VD1 представляет собой первый вариабельный домен легкой цепи, VD2 представляет собой второй вариабельный домен легкой цепи, С представляет собой константный домен легкой

20 цепи, X1 представляет собой линкер, при условии, что он не является CH1, а X2 не содержит Fc-области, *n* равно 0 или 1, а предпочтительно 1. Такой DVD-Ig может содержать две указанных тяжелых цепи и две указанных легких цепи, где каждая из этих цепей содержит вариабельные домены, тандемно присоединенные друг к другу без промежуточной константной области, обычно присутствующей между

25 вариабельными областями, где тяжелая цепь и легкая цепь связаны друг с другом и образуют тандемные функциональные антигенсвязывающие сайты, а пара тяжелой и легкой цепей может быть связана с другой парой тяжелой и легкой цепей с образованием тетрамерного связывающего белка, имеющего четыре функциональных антигенсвязывающих сайта. В другом примере молекула DVD-Ig может содержать

30 тяжелую и легкую цепи, каждая из которых включает три вариабельных домена (VD1, VD2, VD3), тандемно присоединенных друг к другу без промежуточной константной области, обычно присутствующей между вариабельными областями, где тяжелая и легкая цепи могут быть связаны друг с другом и образуют три антигенсвязывающих сайта, а пара тяжелой и легкой цепей может быть связана с другой парой тяжелой и

35 легкой цепей с образованием тетрамерного связывающего белка, имеющего шесть антигенсвязывающих сайтов.

В предпочтительном варианте изобретения связывающий белок DVD-Ig согласно изобретению не только способен связываться с одними и теми же молекулами-мишеньями, связанными с родительскими моноклональными антителами, но также обладают одним

40 или несколькими нужными свойствами, которыми обладают одно или несколько родительских моноклональных антител. Предпочтительно, таким дополнительным свойством является свойство антитела, присущее одному или нескольким родительским моноклональным антителам. Свойствами антител, которые могут быть сообщены связывающему белку DVD-Ig одним или несколькими родительскими

45 моноклональными антителами, являются, но не ограничиваются ими, специфичность к антигену, аффинность к антигену, активность, биологическая функция, распознавание эпитопа, стабильность белка, растворимость белка, эффективность производства, иммуногенность, фармакокинетические свойства, биологическая доступность,

способность перекрестно реагировать с тканями и способность к связыванию с ортологичным антигеном.

Связывающий белок DVD-Ig согласно изобретению связывается по меньшей мере с одним эпитопом человеческого белка DLL4. Неограничивающими примерами

- 5 связывающего белка DVD-Ig согласно изобретению являются связывающий белок DVD-Ig, который связывается с одним или несколькими эпитопами человеческого DLL4; связывающий белок DVD-Ig, который связывается с эпитопом человеческого DLL4 и с эпитопом DLL4 других видов (например, мыши); и связывающий белок DVD-Ig, который связывается с эпитопом человеческого DLL4 и с эпитопом другой молекулы-
- 10 мишени (например, VEGFR2 или VEGFR1).

«Функциональный антигенсвязывающий сайт» связывающего белка представляет собой сайт, способный связываться с антигеном-мишенью. Аффинность связывания антигена связывающего сайта с антигеном необязательно должна быть такой же высокой, как и аффинность родительского антитела, от которого происходит

- 15 антигена связывающий сайт, однако способность связываться с антигеном должна быть детектируемой любым из различных методов, обычно применяемых для оценки связывания антитела с антигеном. Кроме того, аффинности связывания каждого антигена связывающего сайта поливалентного антитела с антигеном необязательно должны быть количественно равноценными.

- 20 Используемые здесь термины «акцептор» и «акцепторное антитело» означают антитело или последовательность нуклеиновой кислоты, содержащие или кодирующие, соответственно, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или 100% от всех аминокислотных последовательностей одной или нескольких каркасных областей (FR). В некоторых вариантах изобретения термин «акцептор» означает аминокислотную последовательность или нуклеотидную последовательность антитела, которая включает или кодирует, соответственно, константную(ые) область(и). В другом варианте изобретения термин «акцептор» означает аминокислотную последовательность или нуклеотидную последовательность антитела, которая содержит или кодирует,
- 25 соответственно, одну или несколько каркасных областей и константных областей. В конкретном варианте изобретения термин «акцептор» означает аминокислотную последовательность или нуклеотидную последовательность человеческого антитела, которое содержит или кодирует, соответственно, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или 100%
- 30 от всех аминокислотных последовательностей одной или нескольких каркасных областей. В соответствии с этим вариантом, акцептор может содержать по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 10 аминокислотных остатков, которые не присутствуют в одном или нескольких конкретных положениях человеческого антитела. Акцепторная
- 35 каркасная область и/или акцепторная(ые) константная(ые) область(и) могут, например, происходить или могут быть получены из гена антитела зародышевой линии, гена зрелого антитела и функционального антитела (например, антител, хорошо известных специалистам, антител, находящихся на стадии конструирования, или коммерчески доступных антител).
- 40

- 45 Используемый здесь термин «канонический» остаток означает остаток в CDR или каркасной области, который определяет конкретную каноническую структуру CDR, определенную Чотиа и др. (см. публикации Chothia et al. *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 227: 799-817 (1992), которые вводятся в настоящее описание

посредством ссылки). В соответствии с описанием Чотия и др., играющие важную роль положения CDR многих антител имеют почти идентичную конформацию пептидного остова, несмотря на значительную вариабельность на уровне аминокислотных последовательностей. Каждая каноническая структура определяет, главным образом, 5 серию углов закручивания пептидного остова для непрерывного сегмента из аминокислотных остатков, образующих петлю.

Используемые здесь термины «донор» и «донорное антитело» означают антитело, содержащее одну или несколько CDR. В предпочтительном варианте изобретения донорным антителом является антитело, происходящее от видов, отличающихся от 10 тех видов, от которых были получены или от которых происходят каркасные области антитела. Термин «донорное антитело», если он относится к гуманизированному антителу, означает нечеловеческое антитело, имеющее одну или несколько CDR.

Используемые здесь термины «каркасная область» или «каркасная последовательность» означают остальные последовательности вариабельной области 15 минус CDR. Поскольку точное определение последовательности CDR может быть дано исходя из других систем (например, см. выше), то термин «каркасная последовательность» может иметь, соответственно, другую интерпретацию. Шесть CDR (CDR-L1, -L2 и -L3 легкой цепи и CDR-H1, -H2 и -H3 тяжелой цепи) также разделяют каркасные области в легкой цепи и в тяжелой цепи на четыре подобласти (FR1, FR2, 20 FR3 и FR4) на каждой цепи, где CDR1 расположена между FR1 и FR2, CDR2 расположена между FR2 и FR3, и CDR3 расположена между FR3 и FR4. Не претендуя на точное определение конкретных подобластей, таких как FR1, FR2, FR3 или FR4, можно также сказать, что каркасная область представляет собой объединенные FR в вариабельной области в одной природной цепи иммуноглобулина. Используемый здесь термин 25 «область FR» означает одну из четырех подобластей, а термин «области FR» означает две или несколько из четырех подобластей, составляющих каркасную область.

Последовательности акцепторных человеческих тяжелых и легких цепей известны специалистам. В одном из вариантов изобретения последовательности акцепторных человеческих тяжелых и легких цепей выбраны из последовательностей, представленных 30 в таблицах 2 и 3.

Таблица 2  
Акцепторные последовательности тяжелой цепи

35

40

45

SEQ ID NO.:	Область белка/ близкородственное семейство зародышевой линии	Последовательность
5		12345678901234567890123456789012
	6 VH2-70/JH6 FR1	EVTLRESPALVKPTQTLTCTFSGFSLS
	7 VH2-70/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
	8 VH2-70/JH6 FR3	RLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAR
10	9 VH2-70/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
	10 VH2-26/JH6 FR1	EVTLKESEGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLS
	7 VH2-26/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
	11 VH2-26/JH6 FR3	RLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDTATYYCAR
15	9 VH2-26/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
	12 VH3-72/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
	13 VH3-72/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVG
	14 VH3-72/JH6 FR3	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR
20	9 VH3-72/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
	15 VH3-21/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
	16 VH3-21/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
	17 VH3-21/JH6 FR3	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
25	9 VH3-21/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
	18 VH1-69/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS
	19 VH1-69/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
	20 VH1-69/JH6 FR3	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
	9 VH1-69/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS

25

30

35

40

45

	21	VH1-18/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFT
	19	VH1-18/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
	22	VH1-18/JH6 FR3	RVTMTTDSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
	9	VH1-18/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
5	35	IGHV4-59 FR1	EVQLQESGPLVKPSETLSLTCTVSGGSIS
	36	IGHV4-59 FR2	WIRQPPGKGLEWIG
	37	IGHV4-59 FR3	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCAR
	38	IGHV4-59/JH FR4	WGQGTLVTVSS
	39	IGHV3-66 FW1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSIS
10	40	IGHV3-66 FW2	WIRQAPGKGLEWIG
	41	IGHV3-66 FW3	RVTISVDTSKNSFYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
	42	IGHV3-66/JH FW4	WGQGTLVTVSS
	43	IGHV4-59 FR1	EVQLQESGPLVKPGETLSLTCTVSGGSIS
	44	IGHV4-59 FR2	WIRQAPGKGLEWIG
	45	IGHV4-59 FR3	RVTISVDTSKNQFYLKLSVRAEDTAVYYCAR
15	46	IGHV4-59/JH FR4	WGQGTLVTVSS
	47	IGHV5-51 FR1	EVQLVQSGTEVKPGESIKISCKVSGGSIS
	48	IGHV5-51 FR2	WIRQMPGKGLEWIG
	49	IGHV5-51 FR3	QVTISVDTSFNTFFLQWSSLKASDTAMYYCAR
	50	IGHV5-51/JH FR4	WGQGTMVTVSS
20	51	IGHV2-70 FR1	EVTLRESPALVKPTQTLTCTVSGGSIS
	52	IGHV2-70 FR2	WIRQPPGKGLEWIG
	53	IGHV2-70 FR3	RVTISVDTSKNQFVLTMNTMDPVDTATYYCAR
	54	IGHV2-70/JH FR4	WGQGTTVTVSS
	55	IGHV3-15 FR1	EVQLLESGGGLVKSGGSLRLSCAASGFTFR
25	56	IGHV3-15 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
	57	IGHV3-15 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCAK
	58	IGHV3-15/JH FR4	WGQGTMVTVSS
	59	IGHV3-43 FR1	EVQLVESGGGVQPGGSLRLSCAASGFTFG
	60	IGHV3-43 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
	61	IGHV3-43 FR3	RFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCAK
30	62	IGHV3-43/JH FR4	WGQGTMVTVSS

**Таблица 3**  
**Акцепторные последовательности легкой цепи**

SEQ ID NO.:	Область белка/ близкородственное семейство зародышевой линии	Последовательность
		12345678901234567890123456789012
	23	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
	24	WYQQKPGQPPKLLIY
	25	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC
35	26	FGGGTKEIKR
	27	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
	28	WYQQKPGQAPRLLIY
	29	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
40	26	FGGGTKEIKR
	30	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC
45		

	31	L15/JK4 FR2	WYQQKPEKAPKSLIY
	32	L15/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
5	26	L15/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
	33	L5/JK4 FR1	DIQMTQSPSSVSASVGDRTVTITC
	34	L5/JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
	32	L5/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
	26	L5/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
	63	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVPQQTASITC
	64	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
10	65	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC
	66	IGLV3-1/JL FR4	FGYGTKVTVL
	67	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVPQQTASITC
	68	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
	69	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC
	70	IGLV3-1/JL FR4	GGGTKLTVLG
15	71	IGLV3-1 FR1	YELTQPPSVSVPQQTASITC
	72	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
	73	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC
	74	IGLV3-1/JL FR4	GGGTKLTVLG
	75	IGLV3-1 FR1	LYVLTQPPSVSVPQQTASITC
20	76	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
	77	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQTMDEADYLC
	78	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKVTVLG
	79	IGKV6D-21 FR1	EYVLTQSPDFQSVPKEKVTITC
	80	IGKV6D-21 FR2	WYQQKPDQSPKLVIY
25	81	IGKV6D-21 FR3	GVPSRFSGSNSGDDATLTINSLEAEDAATYYC
	82	IGKV6D-21/JK FR4	FGQGTKVEIKR
	83	IGKV3D-15 FR1	EYVLTQSPATLSVSPGERATLSC
	84	IGKV3D-15 FR2	WYQQKPGQSPRLVIY
	85	IGKV3D-15 FR3	DIPARFSGSNSGDEATLTISLQSEDFAVYYC
	86	IGKV3D-15/JK FR4	FGQGTRLEIKR
30	87	IGKV4-1 FR1	DYVLTQSPDSLAVSLGERATINC
	88	IGKV4-1 FR2	WYQQKPGQSPKLVIY
	89	IGKV4-1 FR3	GIPDRFSGSNSGDDATLTISLQAEDVAVYYC
	90	IGKV4-1/JK FR4	FGGGTKVEIKR
	91	IGLV3-1 FR1	LPVLTQPPSVSVPQQTASITC
	92	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
35	93	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQTMDEADYLC
	94	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKVTVL
	95	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVPQQTASITC
	96	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
	97	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQTMDEADYLC
40	98	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKLTVL

Используемые здесь термины «ген антитела зародышевой линии» или «генный фрагмент» означают последовательность иммуноглобулина, кодируемую нелимфоидными клетками, которые не подвергались процессу созревания, приводящему к генетической реаранжировке и мутации, для экспрессии конкретного иммуноглобулина. (См., например, Shapiro et al., *Crit. Rev. Immunol.* 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 484: 13-30 (2001)). Одно из преимуществ различных вариантов настоящего изобретения заключается в том, что гены антитела зародышевой линии с большей вероятностью, чем гены зрелого антитела, будут сохранять основные структуры аминокислотной последовательности, характерные для индивидуумов

данного вида, а следовательно, менее вероятно, что они будут распознаваться как последовательности, происходящие из чужеродного источника, при их терапевтическом применении в данных видах.

Используемый здесь термин «ключевой остаток» означает определенные остатки 5 вариабельной области, которые оказывают значительное влияние на специфичность связывания антитела и/или аффинность антитела, а в частности, гуманизированного антитела. Ключевыми остатками являются, но не ограничиваются ими, один или несколько из нижеследующих остатков: остаток, который является смежным с CDR; потенциальный сайт гликозилирования (N- или O-гликозилирования); редкий остаток; 10 остаток, обладающий способностью взаимодействовать с антигеном; остаток, обладающий способностью взаимодействовать с CDR; канонический остаток; остаток в зоне контактирования вариабельной области тяжелой цепи с вариабельной областью легкой цепи; остаток в зоне Верньера; и остаток в области, которая перекрывается с CDR1 вариабельной тяжелой цепи, как определено по Чотиа, и с первой каркасной 15 областью тяжелой цепи, как определено по Кэбату.

Используемый здесь термин «зона Верньера» означает субнабор из каркасных остатков, которые могут осуществлять корректировку структуры CDR и тонкую 20 корректировку для адаптации этих остатков к данному антигену, как описано Foote и Winter (*J. Mol. Biol.*, 224: 487-499 (1992)). Остатки зоны Верньера образуют слой, лежащий в основе CDR, и могут влиять на структуру CDR и аффинность данного антитела.

Используемый здесь термин «нейтрализация» относится к предотвращению 25 биологической активности антигена при его специфическом связывании с антигеном. В одном из вариантов изобретения нейтрализующий связывающий белок связывается с антигеном и снижает его биологическую активность по меньшей мере примерно на 20%, 40%, 60%, 80%, 85% или более.

Термин «активность» включает такую активность, как специфичность/аффинность связывания антитела с антигеном, например, анти-hDLL4 антитела, которое связывается с антигеном DLL4, и/или нейтрализующую активность антитела или анти-hDLL4 30 антитела, которое связывается с hDLL4 и тем самым ингибирует биологическую активность hDLL4, например, ингибирует связывание рецептора в анализе на связывание «лиганд-рецептор», или ингибирует активацию рецептора в анализе, проводимом с использованием репортера человеческого рецептора Notch, или стимулирует пролиферацию в анализе на разрастание эндотелиальных клеток.

Термин «эпитоп» включает любую полипептидную детерминанту, способную 35 специфически связываться с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. В некоторых вариантах изобретения антигенные детерминанты или эпитопы включают химически активные поверхностные группы молекул, таких как аминокислоты, сахарные боковые цепи, фосфорил или сульфонил, а в некоторых вариантах изобретения они могут обладать специфическими трехмерными структурными свойствами и/или могут 40 иметь конкретный заряд. Эпитоп представляет собой область антигена, связывающуюся с антителом. Так, например, эпитоп состоит из аминокислотных остатков области антигена (или его фрагмента), который, как известно, связывается с комплементарным сайтом на специфическом партнере по связыванию. Антиген или его фрагмент могут содержать более чем один эпитоп. Так, например, для специалиста в данной области очевидно, что каждый «антигенсвязывающий сайт» молекулы антитела связывается с 45 эпитопом молекулы антигена, а каждая молекула антигена может иметь один, два, несколько или множество эпитопов. Кроме того, для специалистов в данной области очевидно, что два независимо выделенных антитела против молекулы антигена могут

связываться с одним и тем же эпитопом или с двумя различными эпитопами на молекуле антигена.

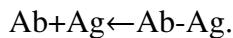
В некоторых вариантах изобретения считается, что антитело специфически связывается с антигеном, если оно распознает антиген-мишень в сложной смеси белков и/или макромолекул. Говорят, что антитела «связываются с одним и тем же эпитопом», если они перекрестно конкурируют с другими антителами (то есть, одно из них предотвращает связывающее или модулирующее действие другого). Кроме того, структурные определения эпитопов (перекрывающиеся, аналогичные, идентичные) являются информативными, а функциональные определения часто являются более релевантными, поскольку они включают структурные параметры (связывание) и функциональные параметры (модуляцию, конкурирование).

Используемый здесь термин «поверхностный плазмонный резонанс» означает оптическое явление, позволяющее проанализировать биоспецифические взаимодействия в реальном времени посредством детектирования изменений концентраций белка в биосенсорной матрице, например, с использованием системы BIAcore® (BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden и Piscataway, NJ). Более подробное описание можно найти в публикациях Jönsson, U., et al. *Ann. Biol. Clin.* 51: 19-26 (1993); Jönsson, U., et al. *BioTechniques* 11: 620-627 (1991); Johnsson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8: 125-131; и Johnnson, B., et al. *Anal. Biochem.* 198: 268-277 (1991).

Используемый здесь термин « $K_{on}$ » означает константу ассоциации связывающего белка (например, антитела) с антигеном с образованием, например, комплекса «антитело/антиген», известного специалистам. « $K_{on}$ » также называется «константой скорости ассоциации» или « $k_a$ », и эти термины являются синонимами. Данная величина означает скорость связывания антитела с его антигеном-мишенью или скорость образования комплекса антитела и антигена, и может быть также представлена нижеследующим уравнением:



Используемый здесь термин « $K_{off}$ » означает константу диссоциации или «константу скорости диссоциации» связывающего белка (например, антитела), например, из комплекса «антитело/антиген», известного специалистам. Данная величина означает скорость диссоциации антитела из его антигена-мишени или разделения комплекса Ab-Ag в течение определенного периода времени с образованием свободного антитела и антигена, и представлена нижеследующим уравнением:



Используемые здесь термины «константа равновесной диссоциации» или « $K_D$ » являются синонимами и означают величину, полученную путем измерения титров при равновесии или путем деления константы скорости диссоциации ( $k_{off}$ ) на константу скорости ассоциации ( $k_{on}$ ). Константа скорости ассоциации, константа скорости диссоциации и константа равновесной диссоциации используются для определения аффинности связывания антитела с антигеном. Методы определения констант скорости ассоциации и диссоциации хорошо известны специалистам. Применение флуоресцентных методов позволяет с высокой степенью чувствительности проанализировать образцы в физиологических буферах при равновесии. Могут быть применены и другие экспериментальные подходы, такие как анализ BIAcore® (анализ на биомолекулярное взаимодействие) и экспериментальное оборудование (например, оборудование, поставляемое компанией BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden). Кроме того, может быть также использован анализ KinExA® (кинетический

эксклюзионный анализ), разработанный компанией Sapidyne Instruments (Boise, Idaho).

Термины «метка» и «детектируемая метка» означают молекулу, присоединяемую к специфически связывающему партнеру, такому как антитело или аналит, например, для обеспечения реакции между членами пары специфического связывания, такими как

5 антитело и аналит, где указанная метка является детектируемой, а указанный партнер по специальному связыванию, например, меченым таким образом антитело или аналит, также является «детектируемо меченый». Таким образом, используемый здесь термин «меченный связывающий белок» означает белок с меткой, включенной в него в целях идентификации указанного связывающего белка. В одном из вариантов

10 изобретения, меткой является детектируемый маркер, который может продуцировать сигнал, детектируемый визуально или с помощью приборов, например, посредством включения радиоактивно меченой аминокислоты или присоединения к полипептиду биотинильных групп, которые могут быть детектированы помеченным авидином (например, стрептавидином, содержащим флуоресцентный маркер или обладающим

15 ферментативной активностью, которая может быть детектирована оптическими или колориметрическими методами). Примерами меток для полипептидов являются, но не ограничиваются ими, радиоизотопы или радионуклиды (например,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{166}\text{Ho}$  и  $^{153}\text{Sm}$ ); хромогены, флуоресцентные метки (например,

20 ФИТЦ, родамин, флуоресцирующие вещества лантанидной группы), ферментативные метки (например, пероксидаза хрена, люцифераза, щелочная фосфатаза); хемилюминесцентные маркеры; биотинильные группы; предварительно определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательностями пары «лейциновая молния», сайтами связывания со «вторыми»

25 антителами, металл-связывающими доменами, эпитопными метками); и магнитные агенты, такие как хелатные комплексы гадолиния. Репрезентативными примерами меток, наиболее часто используемых в иммунноанализах, являются молекулы, которые излучают свет, например, соединения акридиния, и молекулы, обладающие флуоресцентным действием, например, флуоресцеин. В настоящей заявке описаны и

30 другие метки. В этой связи следует отметить, что сама такая молекула не может быть детектируемо меченой, но может стать детектируемой после ее реакции с другой молекулой. Использование «детектируемо меченой» молекулы включает детектируемое мечение последнего типа.

35 Термин «конъюгат антитела» означает связывающий белок, такой как антитело, химически связанное со второй химической молекулой, такой как терапевтическое или цитотоксическое средство. Используемый здесь термин «агент» означает химическое соединение, смесь химических соединений, биологическую макромолекулу или экстракт, полученный из биологических материалов. Предпочтительно, терапевтическими или цитотоксическими средствами являются, но не ограничиваются ими, коклюшный токсин, 40 таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидийбромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантракиндион, митоксанtron, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюокортикоиды, прокайн, тетракайн, лидокаин, пропранолол и пуромицин и его аналоги или гомологи.

45 Используемые здесь термины «кристалл» и «кристаллизованный» относятся к связывающему белку (например, к антителу) или к его антигенсвязывающей части, которые присутствуют в форме кристалла. Кристаллы представляют собой одну из форм твердого состояния вещества, которая отличается от других форм, таких как аморфное твердое состояние или жидкое кристаллическое состояние. Кристаллы состоят

из регулярных, повторяющихся трехмерных кристаллических решеток атомов, ионов, молекул (например, белков, таких как антитела) или молекулярных агрегатов (включая комплексы Fab/антитело). Эти трехмерные кристаллические решетки являются упорядоченными в соответствии с их математическими соотношениями, которые хорошо известны специалистам в данной области. Фундаментальная единица или структурный блок, повторяющиеся в кристаллах, называются асимметрической ячейкой. Повторение асимметрической ячейки в данной структуре, которая соответствует хорошо определенной кристаллографической симметрии, позволяет называть ее «элементарной ячейкой» кристалла. Повторение этой элементарной ячейки посредством регулярной трансляции во всех трех измерениях образует кристалл. См. Giege et al., *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ed.*, (Ducruix and Giege, eds.) (Oxford University Press, New York, 1999), глава 1, стр. 1-16.

Термин «полинуклеотид» означает полимерную форму, состоящую из двух или более нуклеотидов, а именно рибонуклеотидов или дезоксирибонуклеотидов, или модифицированную форму, состоящую из нуклеотидов любого типа. Этот термин включает одноцепочечную и двухцепочечную формы ДНК.

Термин «изолированный полинуклеотид» означает полинуклеотид (например, геномную ДНК, кДНК, синтетическую ДНК или их комбинацию), который, по своему происхождению, не связан с полноразмерным полинуклеотидом или с его частью, вместе с которыми данный «изолированный полинуклеотид» обнаруживается в природе; или полинуклеотид, который функционально присоединен к полинуклеотиду, с которым он не связан в природе; или полинуклеотид, который не существует в природе как часть более крупной последовательности.

Термин «вектор» означает молекулу нукleinовой кислоты, способную осуществлять транспорт другой нукleinовой кислоты, с которой он был связан. Одним из типов вектора является «плазмида», представляющая собой кольцевую двухцепочечную ДНК-петлю, в которую могут быть лигированы дополнительные ДНК-сегменты. Другим типом вектора является вирусный вектор, в вирусный геном которого могут быть лигированы дополнительные ДНК-сегменты. Некоторые векторы обладают способностью автономно реплицироваться в клетке-хозяине, в которую они были встроены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный oriджин репликации и эпизомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэпизомные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина после их введения в эту клетку-хозяина, а затем реплицироваться вместе с геномом хозяина. Кроме того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, к которым они функционально присоединены. Такие векторы называются здесь «рекомбинантными экспрессионными векторами» (или просто «экспрессионными векторами»). В общих чертах, экспрессионные векторы, применяемые в методах рекомбинантных ДНК, часто присутствуют в форме плазмид. В настоящем описании термины «плазмида» и «вектор» могут быть синонимами, поскольку плазмида наиболее часто используется в качестве вектора. Однако настоящее изобретение включает и другие формы экспрессионных векторов, таких как вирусные векторы (например, дефектные по репликации ретровирусы, адено- и аденоассоциированные вирусы), которые имеют эквивалентные функции. В настоящем изобретении могут быть также использованы РНК-варианты векторов (включая вирусные РНК-векторы).

Термин «функционально присоединенный» относится к положениям в областистыка (юкста-положениям), где описанные компоненты находятся в такой взаимосвязи, которая соответствующим образом обеспечивает их функционирование. Регуляторная

последовательность, «функционально присоединенная» к кодирующей последовательности, лигирована так, чтобы экспрессия кодирующей последовательности достигалась в условиях, совместимых с условиями действия регуляторных последовательностей. «Функционально присоединенными» последовательностями

- 5 являются последовательности регуляции экспрессии, которые являются смежными с представляющим интерес геном, и последовательности регуляции экспрессии, которые осуществляют регуляцию представляющего интерес гена *in trans*, то есть расположены не на молекуле представляющего интерес гена, а на молекуле другой нукleinовой кислоты, а также последовательности регуляции экспрессии, которые расположены на
- 10 той же самой молекуле нукleinовой кислоты, но на некотором расстоянии от представляющего интерес гена. Используемый здесь термин «последовательность регуляции экспрессии» означает полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. Последовательностями регуляции экспрессии являются
- 15 соответствующие последовательности инициации транскрипции, последовательности терминации транскрипции, промоторы и энхансерные последовательности; сигналы для эффективного РНК-процессинга, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, стабилизирующие цитоплазматическую мРНК; последовательности, повышающие эффективность трансляции (то есть,
- 20 консенсусная последовательность Козака); последовательности, повышающие стабильность белка, и, если это необходимо, последовательности, повышающие уровень секреции белка. Природа таких регуляторных последовательностей варьируется в зависимости от типа организма-хозяина, например, в прокариотах такими регуляторными последовательностями обычно являются промотор, сайт связывания
- 25 с рибосомой и последовательность терминации транскрипции, а в эукариотах такими регуляторными последовательностями обычно являются промоторы и последовательность терминации транскрипции. Термин «регуляторные последовательности» включает компоненты, присутствие которых играет важную роль в экспрессии и процессинге, и эти последовательности могут также включать
- 30 дополнительные компоненты, присутствие которых является предпочтительным, например, лидерные последовательности и последовательности партнеров по слиянию.

Термин «трансформация» означает любой способ, с помощью которого экзогенная нукleinовая кислота (например, молекула ДНК) может быть введена в клетку-хозяина. Трансформация может быть осуществлена в природных условиях или в условиях,

- 35 искусственно созданных различными методами, хорошо известными специалистам. Трансформация может быть осуществлена любым методом, подходящим для встраивания чужеродных последовательностей нукleinовой кислоты в прокариотические или эукариотические клетки-хозяева. Этот метод выбирают исходя из трансформируемой клетки-хозяина, и таким методом может быть, но не
- 40 ограничивается ими, получение плазмиды, проникающей через клеточную мембрану, инфицирование вирусом, электропорация, липофекция и бомбардировка частицами. Указанными «трансформированными» клетками являются стабильно трансформированные клетки, в которых встроенная ДНК обладает способностью реплицироваться либо как автономно реплицирующаяся плазмида, либо как часть
- 45 хромосомы хозяина. Такими клетками также являются клетки, которые временно экспрессируют встроенную ДНК или РНК в течение ограниченного периода времени.

Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин») означает клетку, в которую была встроена экзогенная ДНК. В одном из вариантов изобретения

клетка-хозяин включает две или более (например, множество) нуклеиновых кислот, кодирующих антитела, например, клетки-хозяева, описанные, например, в патенте США № 7262028. Эти термины относятся не только к конкретно рассматриваемой клетке, но также и к потомству такой клетки. Поскольку в последующих генерациях 5 могут присутствовать некоторые модификации, обусловленные либо мутацией, либо влиянием окружающей среды, то такое потомство, фактически, не может быть идентичным родительской клетке, но оно также входит в объем используемого здесь термина «клетка-хозяин». В одном из вариантов изобретения клетками-хозяевами являются прокариотические и эукариотические клетки, выбранные из царства живых 10 организмов. В другом варианте изобретения эукариотическими клетками являются клетки простейших, грибов, растений и животных. В другом варианте изобретения клетками-хозяевами являются, но не ограничиваются ими, прокариотическая клеточная линия *E.coli*; клеточные линии млекопитающих СНО, НЕК 293, COS, NS0, SP2 и PER.C6; клеточная линия насекомых Sf9; и клеточная линия грибов, таких как *Saccharomyces* 15 *cerevisiae*.

Для получения рекомбинантных ДНК, а также для олигонуклеотидного синтеза, культивирования и трансформации тканей могут быть применены стандартные методы (например, электропорация, липофекция). Методы с применением ферментативных реакций и методы очистки могут быть осуществлены в соответствии с инструкциями 20 производителей или в соответствии со стандартными процедурами, известными специалистам, либо в соответствии с описанием в настоящей заявке. Вышеупомянутые методы и процедуры могут быть осуществлены стандартными методами, хорошо известными специалистам, и описанными в различных общих и специальных руководствах, цитируемых и обсуждаемых в настоящей заявке. См., например, Sambrook 25 et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989).

Термин «трансгенный организм», известный специалистам, означает организм, имеющий клетки, содержащие трансген, где указанный трансген, введенный в организм (или «предок» такого организма), экспрессирует полипептид, который в природе не 30 экспрессируется в данном организме. «Трансген» представляет собой ДНК-конструкцию, которая стабильно и функционально интегрируется в геном клетки, от которой происходит такой трансгенный организм, и направляет экспрессию кодируемого генного продукта в клетки или ткани трансгенного организма одного или нескольких типов.

Используемые здесь термины «регуляция» и «модуляция» являются синонимами и 35 означают изменения или модификации активности представляющей интерес молекулы (например, биологической активности hDLL4). Модуляция может приводить к увеличению или снижению величины определенной активности или функции представляющей интерес молекулы. Репрезентативными активностями или функциями молекулы являются, но не ограничиваются ими, связывающие свойства, ферментативная 40 активность, активация клеточного рецептора и передача сигнала.

В соответствии с этим, термин «модулятор» означает соединение, способное изменять или модифицировать активность или функцию представляющей интерес молекулы (например, биологической активности hDLL4). Так, например, модулятор может способствовать увеличению или снижению величины определенной активности или 45 функции представляющей интерес молекулы, по сравнению с величиной активности или функции, наблюданной в отсутствие данного модулятора. В некоторых вариантах изобретения модулятором является ингибитор, который способствует снижению величины по меньшей мере одной активности или функции молекулы.

Репрезентативными ингибиторами являются, но не ограничиваются ими, белки, пептиды, антитела, пептидные антитела, углеводы и небольшие органические молекулы. Пептидные антитела описаны, например, в публикации РСТ № WO01/83525.

5 Термин «агонист» означает модулятор, который, при его контактировании с представляющей интерес молекулой, вызывает увеличение величины определенной активности или функции данной молекулы, по сравнению с величиной активности или функции, наблюдавшейся в отсутствие данного агониста. Конкретными представляющими интерес агонистами являются, но не ограничиваются ими, члены пути передачи сигнала Notch, полипептиды и нуклеиновые кислоты DLL4, углеводы или любые другие 10 молекулы, которые связываются с DLL4.

Используемые здесь термины «антагонист» или «ингибитор» означают модулятор, который, при его контактировании с представляющей интерес молекулой, вызывает снижение величины определенной активности или функции данной молекулы, по сравнению с величиной активности или функции, наблюдавшейся в отсутствие данного 15 антагониста. Конкретными представляющими интерес антагонистами являются антагонисты, которые блокируют или модулируют биологическую или иммунологическую активность DLL4, а в частности, человеческого DLL4 (hDLL4). Антагонистами и ингибиторами hDLL4 могут быть, но не ограничиваются ими, белки, нуклеиновые кислоты, углеводы или любые другие молекулы, которые связываются с 20 hDLL4 и/или с DLL4 грызунов.

Используемый здесь термин «эффективное количество» означает количество терапевтического средства, которое является достаточным для ослабления тяжести расстройства или одного или нескольких его симптомов и/или для снижения их продолжительности, и для предупреждения прогрессирования расстройства, а также 25 для достижения ремиссии данного расстройства, для предотвращения или предупреждения возникновения рецидивов, развития, начала или прогрессирования одного или нескольких симптомов, ассоциированных с данным расстройством, для обнаружения данного расстройства, либо для усиления или улучшения профилактического(их) или терапевтического(их) эффекта(ов) другого терапевтического 30 средства (например, профилактического или терапевтического средства).

Термины «пациент» и «индивидуум» могут быть использованы здесь как синонимы и означают животное, такое как млекопитающее, включая приматов (например, человека, обезьян и шимпанзе), млекопитающих, не являющихся приматами (например, коров, свиней, верблюдов, лам, лошадей, коз, кроликов, овец, хомячков, морских свинок, 35 кошек, собак, крыс, мышей и китов), птиц (например, уток или гусей) и акул. При этом предпочтительным пациентом или индивидуумом является человек, например, человек, который проходит лечение или обследование по поводу какого-либо заболевания, расстройства или состояния; человек с риском развития у него данного заболевания, расстройства или состояния; человек, страдающий данным заболеванием, расстройством 40 или состоянием; и/или человек, подвергающийся лечению данного заболевания, расстройства или состояния. При этом более предпочтительно, если данный пациент или индивидуум подвергается лечению по поводу рака или другого заболевания или обследованию на наличие рака или другого заболевания, при котором имеющееся нарушение экспрессии DLL4 подтверждает наличие рака или другого заболевания, а 45 ингибирование или подавление активности DLL4 являются желательными для лечения рака или другого заболевания.

Используемый здесь термин «образец» употребляется в самом широком смысле. Используемый здесь термин «биологический образец» включает, но не ограничивается

ими, любое количество вещества, взятое у живого существа или у ранее живого существа. Такими живыми существами являются, но не ограничиваются ими, человек, мыши, крысы, обезьяны, собаки, кролики и другие животные. Указанными веществами являются, но не ограничиваются ими, кровь (например, цельная кровь), плазма, сыворотка, моча, амниотическая жидкость, синовиальная жидкость, эндотелиальные клетки, лейкоциты, моноциты, другие клетки, органы, ткани, костный мозг, лимфоузлы и селезенка.

5 Термины «компонент», «компоненты» и «по меньшей мере один компонент» означают иммобилизованное антитело, детектирующее или конъюгированное антитело, 10 контроль, калибровочный маркер, серию калибровочных маркеров, набор тест-соединений для определения чувствительности, контейнер, буфер, разбавитель, соль, фермент, кофактор для фермента, детектирующий реагент, реагент/раствор для предварительной обработки, субстрат (например, в виде раствора), блокирующий раствор и т.п., которые могут быть включены в набор для анализа тест-образца, такого 15 как проба мочи, сыворотки или плазмы пациента, проводимого в соответствии с описанными здесь методами и другими методами, известными специалистам. Таким образом, в контексте настоящего изобретения термины «по меньшей мере один компонент», «компонент» и «компоненты» могут включать полипептид или другие аналиты, описанные выше, такие как композиция, содержащая анализ, такой как 20 полипептид, необязательно иммобилизованный на твердом носителе, например, посредством связывания с антителом против анализа (например, против полипептида). Некоторые компоненты могут присутствовать в растворе или в лиофилизованной форме, которую затем разводят для использования в анализе.

Термин «риск» означает возможность или вероятность осуществления конкретного 25 события либо в настоящее время, либо в какой-либо момент в будущем. «Стратификация риска» означает набор известных клинических факторов риска, который позволяет врачу классифицировать пациентов как пациентов с низким, умеренным, высоким или очень высоким риском развития конкретного заболевания, расстройства или состояния.

Термин «специфический» и «специфичность», употребляемый в связи с 30 взаимодействием между членами специфически связывающейся пары, например, антигена или его фрагмента и антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, относится к селективной реактивности данного взаимодействия. Термин «специфически связывается с ...» и аналогичные термины относятся к способности антител (или их антигенсвязывающих фрагментов) специфически связываться с анализом (или с его 35 фрагментом), но не с другими молекулами.

«Партнер по специальному связыванию» представляет собой член специфически связывающейся пары. Специфически связывающаяся пара содержит две различных молекулы, каждая из которых специфически связывается друг с другом по химическому или физическому механизму. Поэтому помимо специфически связывающейся пары, 40 такой как антиген-антитело, могут быть использованы и другие специфически связывающиеся пары, которые могут включать биотин и avidin (или стрептавидин), углеводы и лектины, комплементарные нуклеотидные последовательности, молекулы эффекторов и рецепторов, кофакторы и ферменты, ингибиторы ферментов и ферменты и т.п. Кроме того, специфически связывающиеся пары могут включать члены, которые 45 являются аналогами исходных специфически связывающихся членов, таких как, например, анализ-аналог. Иммунореактивными специфически связывающимися членами являются антигены, фрагмент антигена и антитела, включая моноклональные и поликлональные антитела, а также комплексы, фрагменты и варианты (включая

фрагменты вариантов), независимо от того, являются ли они выделенными или рекомбинантно продуцированными.

Используемый здесь термин «вариант» означает полипептид, который, по своей аминокислотной последовательности, отличается от данного полипептида (например,

5 полипептида DLL4 или анти-DLL4 антитела), что обусловлено добавлением (например, инсерцией), делецией или консервативной заменой аминокислот, но при этом сохраняет биологическую активность данного полипептида (например, вариант DLL4 может конкурировать с DLL4 дикого типа за связывание с анти-DLL4 антителом, если вариант DLL4 сохраняет исходный антигенсвязывающий сайт (эпитоп) DLL4 дикого типа).

10 Консервативная аминокислотная замена, то есть замена одной аминокислоты на другую аминокислоту с аналогичными свойствами (например, гидрофильностью и степенью распределения заряженных областей), может быть легко осуществлена специалистом, поскольку обычно такая замена является весьма несущественной. Такие незначительные замены могут быть, отчасти, идентифицированы путем определения гидропатического

15 индекса аминокислот, известного специалистам (см., например, Kyte et al., *J. Mol. Biol.* 157: 105-132 (1982)). Гидропатический индекс аминокислот определяют исходя из их гидрофобности и заряда. Специалистам в данной области известно, что при замене аминокислот на аминокислоты с аналогичными гидропатическими индексами функции белка могут быть сохранены. В одном из аспектов изобретения, аминокислоты, имеющие

20 гидропатические индексы  $\pm 2$ , являются замененными. Гидрофильность аминокислот может быть также использована для выявления замен, которые должны приводить к получению белков, сохраняющих свою биологическую функцию. Определение гидрофильности аминокислот в данном пептиде позволяет вычислить наибольшую локальную среднюю гидрофильность этого пептида, которая, как сообщалось, является

25 ценным параметром, хорошо коррелирующим с антигенностью и иммуногенностью (см., например, патент США № 4554101). Замена аминокислот, имеющих аналогичные значения гидрофильности, может приводить к получению пептидов, сохраняющих биологическую активность, например, иммуногенность, как известно специалистам. В одном из аспектов изобретения каждую аминокислоту заменяют аминокислотой,

30 имеющей величину гидрофильности в пределах  $\pm 2$ . На индекс гидрофобности и на величину гидрофильности аминокислот влияет конкретная боковая цепь этой аминокислоты. Согласно этому наблюдению, выбор аминокислотных замен, совместимых с биологической функцией, зависит от относительного сходства аминокислот, а в частности, от сходства боковых цепей этих аминокислот, что может

35 быть выявлено по гидрофобности, гидрофильности, заряду, размеру и другим свойствам аминокислот. Термин «вариант» может быть также использован для описания полипептида или его фрагмента, который был подвергнут альтернативному процессингу, такому как протеолиз, фосфорилирование или другая посттрансляционная модификация, и который сохраняет свою биологическую активность или реактивность по отношению

40 к антигену, например, способность связываться с DLL4. Используемый здесь термин «вариант» включает фрагменты варианта, если это не противоречит контексту описания изобретения.

Используемый здесь термин «образец» употребляется в самом широком смысле.

Используемый здесь термин «биологический образец» включает, но не ограничивается 45 ими, любое количество вещества, взятое у живого существа или у ранее живого существа. Такими живыми существами являются, но не ограничиваются ими, человек, мыши, крысы, обезьяны, собаки, кролики и другие животные. Указанными веществами являются, но не ограничиваются ими, кровь, сыворотка, моча, синовиальная жидкость,

клетки, органы, ткани, костный мозг, лимфоузлы и селезенка.

### I. Антитела, которые связываются с человеческим DLL4

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к изолированным

человеческим моноклональным антителам или к их антигенсвязывающим частям,

5 которые связываются с DLL4 с высокой аффинностью, низкой скоростью диссоциации и/или с высокой нейтрализующей активностью. Такие человеческие антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с DLL4, преимущественно могут быть использованы в медицине в качестве терапевтических средств, которые могут быть введены человеку и дают минимальный иммунный ответ или вообще не

10 производят иммунного ответа у человека на вводимый терапевтический DLL4-связывающий белок. В соответствии с этим, у пациента может наблюдаться благоприятный эффект от введения таких полностью человеческих DLL4-связывающих белков в процессе всего курса повторных введений. В других аспектах настоящее изобретение относится к химерным антителам, которые связываются с DLL4, и к CDR-

15 привитым антителам или к их антигенсвязывающим частям, которые связываются с DLL4. Предпочтительными антителами или их частями являются изолированные антитела. Предпочтительными антителами согласно изобретению являются нейтрализующие человеческие анти-DLL4 антитела.

#### A. Способ получения анти-DLL4 антител

20 Антитела согласно изобретению могут быть получены любым из ряда известных методов. Предпочтительным методом является технология представления мРНК PROfusion, описанная в примере 2 настоящей заявки. Другим методом является иммунизация трансгенных грызунов (например, трансгенных мышей), которые несут функциональный комплемент человеческого гена иммуноглобулина, человеческим

25 DLL4 или его антигенсвязывающей частью, с последующим проведением стандартной гибридомной технологии для получения гибридом, экспрессирующих полностью человеческие моноклональные антитела, которые связываются с человеческим DLL4. Рекомбинантные человеческие антитела, полученные таким методом, имеют вариабельные и константные области, происходящие от последовательностей

30 иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Такие методы позволяют получить полностью человеческие DLL4-связывающие белки и не требуют какого-либо дополнительного проведения одного или нескольких раундов гуманизации в целях снижения уровня антигенностии, источником которой являются нечеловеческие молекулы моноклонального анти-DLL4 антитела. В соответствии с этим, методы, проводимые с

35 использованием материала, происходящего от множества видов, являются менее предпочтительными, но, тем не менее, они могут быть применены.

Следует также отметить, что используемый здесь термин «моноклональное антитело» не ограничивается антителами, полученными с применением гибридомной технологии. Термин «моноклональное антитело» означает антитело, происходящее от одного клона, 40 включая любые эукариотические, прокариотические или фаговые клонь, независимо от метода, которым оно было получено.

Дополнительные аспекты различных методов, которые могут быть применены для получения молекул моноклональных анти-DLL4 антител согласно изобретению, описаны ниже.

#### 45 1. Получение анти-DLL4 моноклональных антител с помощью гибридомной технологии

Моноклональные антитела могут быть получены с применением методов широкого ряда, известных специалистам, включая применение гибридомных технологий, рекомбинантных методов и методов фагового представления или их комбинаций. Так,

например, моноклональные антитела могут быть продуцированы гибридомными методами, включая методы, известные специалистам и описанные, например, в публикации Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual, second edition*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988); Hammerling, et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, pages 563-681 (Elsevier, New York, 1981) (указанные публикации во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки). Методы 5 продуцирования и скрининга специфических антител с применением гибридомной технологии являются рутинными и хорошо известны специалистам. В одном из вариантов настоящее изобретение относится к способам получения моноклональных 10 антител, а также к антителам, полученным способом, включающим культивирование гибридомных клеток, секрецирующих антитело согласно изобретению, где предпочтительно указанную гибридому получают путем слияния спленоцитов, выделенных у мышей, иммунизированных антигеном согласно изобретению, с 15 миеломными клетками, а затем скрининга гибридом, полученных посредством такого слияния, на гибридомные клоны, секрецирующие антитело, способное связываться с полипептидом согласно изобретению. Вкратце, мышь может быть иммунизирована антигеном DLL4. В предпочтительном варианте изобретения антиген DLL4 вводят вместе с адьювантом для стимуляции иммунного ответа. Такими адьювантами являются 20 полный или неполный адьюvant Фрейнда, RIBI (мурамил-дипептиды) или ISCOM (иммуностимулирующие комплексы). Такие адьюванты могут защищать полипептид от быстрого диспергирования путем его помещения в местный депозитарий, либо они 25 могут содержать вещества, стимулирующие секрецию факторов хозяина, которые индуцируют хемотаксис макрофагов и других компонентов иммунной системы. Если вводится полипептид, то схема иммунизации будет предпочтительно включать два или более введений полипептида в течение нескольких недель, однако, данный полипептид может быть также введен и один раз.

После иммунизации животного антигеном DLL4, у этого животного могут быть 30 продуцированы антитела, и/или от этого животного могут быть получены антитело-продуцирующие клетки. Сыворотку, содержащую анти-DLL4 антитело, получают путем забора крови у животного или его умерщвления. Сыворотка может быть использована в том виде, в каком она была получена от животного, и из этой сыворотки может быть выделена иммуноглобулиновая фракция, либо из этой сыворотки могут быть выделены анти-DLL4 антитела. Полученные таким образом сыворотка или иммуноглобулины являются 35 поликлональными и имеют неоднородный набор свойств.

После детектирования иммунного ответа, антитела, специфичные к антигену DLL4, 40 например, детектируют в мышиной сыворотке, а затем у мышей извлекают селезенку и выделяют спленоциты. Затем спленоциты подвергают слиянию хорошо известными методами с любыми подходящими миеломными клетками, например, с клетками, происходящими от клеточной линии SP20, имеющейся в Американской коллекции типовых культур (ATCC, Manassas, Virginia, US). Гибридомы отбирают и клонируют 45 путем лимитирующего разведения. После этого гибридомные клоны анализируют методами, известными специалистам, на клетки, секрецирующие антитела, способные связываться с DLL4. Асцитная жидкость, которая обычно содержит высокие уровни антител, может быть получена путем иммунизации мышей позитивными гибридомными клонами.

В другом варианте изобретения антитело-продуцирующие иммортализованные гибридомы могут быть получены от иммунизированного животного. После иммунизации животных умерщвляют, и В-клетки селезенки подвергают слиянию с

иммортализованными миеломными клетками методом, хорошо известным специалистам. См., например, Harlow and Lane, см. выше. В предпочтительном варианте изобретения миеломные клетки не секретируют иммуноглобулиновые полипептиды (несекреторная клеточная линия). После слияния и отбора на резистентность к антибиотикам,

- 5 гибридомы скринируют с использованием DLL4 или его части, либо клеток, экспрессирующих DLL4. В предпочтительном варианте изобретения предварительный скрининг осуществляют с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) или радиоиммуноанализа (РИА), и предпочтительно ELISA. Пример ELISA-скрининга приводится в публикации заявки РСТ № WO 00/37504, которая вводится в настоящее  
10 описание посредством ссылки.

Гибридомы, продуцирующие анти-DLL4 антитела, отбирают, клонируют, а затем скринируют на нужные свойства, включая стабильный рост гибридом, высокий уровень продуцирования антител, и желательные свойства антител, как обсуждается ниже.

- 15 Гибридомы могут быть культивированы и размножены *in vivo* у сингенных животных, у животных, у которых отсутствует иммунная система, например, у «голых» мышей, либо *in vitro* в клеточной культуре. Методы отбора, клонирования и размножения гибридом хорошо известны среднему специалисту в данной области.

20 В предпочтительном варианте изобретения гибридомами являются мышиные гибридомы, описанные выше. В другом варианте изобретения гибридомы продуцируют у животных, не являющихся человеком или мышами, например, у таких животных, как крысы, овцы, свиньи, козы, крупный рогатый скот или лошади. В еще одном предпочтительном варианте изобретения, гибридомами являются человеческие гибридомы, в которых человеческая несекреторная миелома гибридизирована с человеческими клетками, экспрессирующими анти-DLL4 антитело.

25 Фрагменты антител, распознающие специфические эпитопы, могут быть получены известными методами. Так, например, Fab- и F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты согласно изобретению могут быть получены путем протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина с использованием ферментов, таких как папаин (для получения Fab-фрагментов) или пепсин (для получения F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов). F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты содержат вариабельную 30 область, константную область легкой цепи и домен CH1 тяжелой цепи.

## 2. Получение анти-DLL4 моноклональных антител с использованием SLAM

В другом аспекте изобретения рекомбинантные антитела получают из одиночных выделенных лимфоцитов в соответствии с процедурой, называемой специалистами методом отбора антитело-продуцирующих лимфоцитов (SLAM), описанным в патенте США № 5627052, в публикации заявки РСТ WO 92/02551 и в публикации Babcock, J.S. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7843-7848 (1996). В этом методе одиночные клетки, секрецииющие представляющие интерес антитела, например, лимфоциты, происходящие от любого иммунизированного животного, описанного в разделе I.A.1 (см. выше), скринируют с помощью анализа методом антитело-специфических гемолитических бляшек, где антиген DLL4, субъединицу DLL4 или ее фрагмент подвергают взаимодействию с барабаными эритроцитами с помощью линкера, такого как биотин, и используют для идентификации одиночных клеток, секрецииющих антитела, специфичные к DLL4. 40 После идентификации представляющих интерес антитело-секрецииющих клеток, кДНК вариабельной области тяжелой и легкой цепей извлекают из клеток посредством ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), после чего такие вариабельные области могут быть экспрессированы в окружении соответствующих константных областей иммуноглобулинов (например, человеческих константных областей) в клетках-хозяевах млекопитающих, таких как клетки COS или СНО. Эти клетки-хозяева,

трансфицированные амплифицированными последовательностями иммуноглобулина, происходящими от *in vivo* отобранных лимфоцитов, могут быть подвергнуты дополнительному анализу и отбору *in vitro*, например, путем пэннинга трансфицированных клеток в целях выделения клеток, экспрессирующих антитела

5 против DLL4. Затем амплифицированные последовательности иммуноглобулина могут быть модифицированы *in vitro*, например, методами аффинного созревания *in vitro*. См., например, публикацию заявки PCT WO 97/29131 и публикацию заявки PCT WO 00/56772.

### **3. Получение анти-DLL4 моноклональных антител с использованием трансгенных животных**

10 В другом варианте изобретения антитела продуцируют путем иммунизации животного, не являющегося человеком и содержащего некоторые или все локусы человеческих иммуноглобулинов, антигеном DLL4. В предпочтительном варианте изобретения животное, не являющееся человеком, представляет собой трансгенную мышь XENOMOUSE®, то есть искусственно сконструированный штамм мыши, который

15 содержит крупные фрагменты локусов человеческого иммуноглобулина и является дефицитным по производству мышиного антитела. См., например, Green et al. *Nature Genetics* 7:1 3-21 (1994) и патенты США №№ 5916771, 5939598, 5985615, 5998209, 6075181, 6091001, 6114598 и 6130364. См. также публикации заявок PCT WO 91/10741, WO 94/ 02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/ 20 45031, WO 99/53049, WO 00/09560 и WO 00/037504. Трансгенная мышь XENOMOUSE® продуцирует репертуар полностью человеческих антител, подобных антителам взрослого человека, и генерирует антигенспецифические человеческие моноклональные антитела. Трансгенная мышь XENOMOUSE® содержит приблизительно 80% репертуара

25 человеческих антител, что обусловлено введением фрагментов локусов человеческой тяжелой цепи и х локусов человеческой легкой цепи, имеющих размер мегаоснований и конфигурацию зародышевых линий YAC. См. публикации Mendez et al., *Nature Genetics* 15: 146-156 (1997), Green & Jakobovits *J. Exp. Med.* 188: 483-495 (1998), описание которых вводится в настоящее описание посредством ссылки.

### **4. Получение анти-DLL4 моноклональных антител с использованием библиотек рекомбинантных антител**

30 Методы *in vitro* могут быть также применены для получения антител согласно изобретению, где указанную библиотеку антител скринируют для идентификации антитела, обладающего нужной специфичностью связывания с DLL4. Методы такого скрининга библиотек рекомбинантных антител хорошо известны специалистам и

35 включают методы, описанные, например, в патенте США № 5223409 (Ladner et al.); в публикации заявки PCT № WO 92/18619 (Kang et al.); в публикации заявки PCT № WO 91/17271 (Dower et al.); в публикации заявки PCT № WO 92/20791 (Winter et al.); в публикации заявки PCT № WO 92/15679 (Markland et al.); в публикации заявки PCT № WO 93/01288 (Breitling et al.); в публикации заявки PCT № WO 92/01047 (McCafferty et al.); в публикации заявки PCT № WO 92/09690 (Garrard et al.); Fuchs et al., *Bio/Technology*, 9: 1369-1372 (1991); Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridomas*, 3: 81-85 (1992); Huse et al., *Science*, 246: 1275-1281 (1989); McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990); Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992); Clarkson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992); Garrard et al., *Bio/Technology*, 9: 1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., *Nucl Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991); Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991); в публикации заявки на патент США № 2003/0186374; и в публикации заявки PCT № WO 97/29131, которые вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

Библиотека рекомбинантных антител может быть получена у индивидуума, иммунизированного DLL4 или частью DLL4. Альтернативно, библиотека рекомбинантных антител может быть получена у индивидуума, ранее не участвующего в экспериментах, то есть у индивидуума, который не был иммунизирован DLL4,

5 например, может быть получена библиотека человеческих антител, происходящая от человека, который не был иммунизирован человеческим DLL4. Антитела согласно изобретению отбирают путем скрининга библиотеки рекомбинантных антител с использованием пептида, содержащего человеческий DLL4, в целях получения антител, распознающих DLL4. Методы проведения такого скрининга и отбора хорошо известны

10 специалистам и описаны в публикациях, указанных в предыдущем параграфе. Для отбора антител согласно изобретению, обладающих конкретной аффинностью связывания с DLL4, таких как антитела, которые диссоциируют из человеческого DLL4 с конкретной константой скорости диссоциации  $K_{off}$ , может быть применен хорошо известный метод поверхностного плазмонного резонанса, который позволяет проводить

15 отбор антител, имеющих нужную константу скорости диссоциации  $K_{off}$ . Для отбора антител согласно изобретению, обладающих конкретной активностью нейтрализации hDLL4, таких как антитела с конкретным значением  $IC_{50}$ , могут быть применены стандартные методы, известные специалистам в области анализа на ингибиование

20 активности DLL4.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному антителу или к его антигенсвязывающей части, которые связываются с человеческим DLL4. Предпочтительным антителом является нейтрализующее антитело. В различных вариантах изобретения указанным антителом является рекомбинантное антитело или 25 моноклональное антитело. Так, например, антитела согласно изобретению могут быть также получены различными методами фагового представления, известными специалистам. В методах фагового представления функциональные домены антител представлены на поверхности фаговых частиц, которые несут полинуклеотидные последовательности, кодирующие эти домены. Такой фаг может быть использован для 30 представления антигенсвязывающих доменов, экспрессированных из репертуара или комбинаторной библиотеки антител (например, человеческих или мышиных антител). Фаг, экспрессирующий антигенсвязывающий домен, который связывается с представляющим интерес антигеном, может быть отобран или идентифицирован с использованием антигена, например, меченого антигена или антигена, связанного с 35 твердой поверхностью или сферой или иммобилизированного на этой поверхности или сфере. Фагом, используемым в этих методах, обычно является нитчатый фаг, включающий связывающие домены фагов fd и M13, экспрессируемые из фага, имеющего домены Fab-фрагмента, Fv-фрагмента или стабилизированного дисульфидом Fv-фрагмента антител, рекомбинантно присоединенные к белку фагового гена III или VIII. 40 Репрезентативными методами фагового представления, которые могут быть применены для получения антител согласно изобретению, являются методы, описанные Brinkmann et al., *J. Immunol. Methods* 182: 41-50 (1995); Ames et al., *J. Immunol. Methods* 184: 177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958 (1994); Persic et al., *Gene* 187:9-18 (1997); Burton et al., *Advances in Immunology* 57: 191-280 (1994); в заявке PCT № PCT/GB91/01134; в публикациях заявок PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; и в патентах США №№ 5698426; 5223409; 45 5403484; 5580717; 5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908; 5516637; 5780225; 5658727; 5733743 и 5969108, которые во всей своей полноте вводятся в настоящее описание

посредством ссылки.

Как описано в цитируемых выше работах, после отбора фага, антитело-кодирующие области фага могут быть выделены и использованы для получения полноразмерных антител, включая человеческие антитела или любой другой нужный

<sup>5</sup> антигенсвязывающий фрагмент, и экспрессированы в любом нужном хозяине, включая клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений, дрожжи и бактерии, например, подробно описанные ниже. Так, например, способы рекомбинантного продуцирования Fab-, Fab'- и F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов могут быть также осуществлены с применением методов, известных специалистам, таких как методы, описанные в <sup>10</sup> публикации заявки PCT WO 92/22324; и в публикациях Mullinax et al., *BioTechniques* 12 (6): 864-869 (1992); и Sawai et al., *Am. J. Reprod. Immunol.* 34: 26-34 (1995); и Better et al., *Science* 240: 1041-1043 (1988) (указанные публикации во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки). Примерами методов, которые могут быть применены для продуцирования одноцепочечных Fv-фрагментов и антител, являются <sup>15</sup> методы, описанные в патентах США 4946778 и 5258498; и в публикациях Huston et al., *Methods in Enzymology* 203: 46-88 (1991); Shu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7995-7999 (1993); и Skerra et al., *Science* 240: 1038-1041 (1988).

В качестве альтернативы скринингу библиотек рекомбинантных антител методом фагового представления, используемому для идентификации антител согласно <sup>20</sup> изобретению, могут быть применены и другие методы, известные специалистам в области скрининга крупных комбинаторных библиотек. Одним из типов альтернативной экспрессионной системы является система, в которой библиотеку рекомбинантных антител экспрессируют в виде гибрида «РНК-белок», как описано в публикации заявки PCT WO 98/31700 (Szostak и Roberts), и в публикации Roberts & Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12297-12302 (1997). В этой системе ковалентное связывание осуществляется между мРНК и пептидом или белком, которые она кодирует, посредством *in vitro* трансляции синтетических мРНК, несущих у своего 3'-конца пуромицин, то есть антибиотик-акцептор пептидила. Таким образом, специфическая мРНК может быть обогащена из комплексной смеси мРНК (например, комбинаторной библиотеки) исходя <sup>25</sup> из свойств кодируемого пептида или белка, например, антитела или его части, таких как связывание антитела или его части с антигеном с двойной специфичностью. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие антитела или их части, выявленные путем скрининга указанных библиотек, могут быть экспрессированы <sup>30</sup> описанными здесь рекомбинантными методами (например, в клетках-хозяевах млекопитающих), и кроме того, они могут быть подвергнуты последующему аффинному созреванию путем проведения либо дополнительных раундов скрининга гибридов «мРНК-пептид», где в их первоначально отобранную(ые) последовательность(и) были <sup>35</sup> введены мутации, либо другими методами аффинного созревания рекомбинантных антител *in vitro*, описанными выше. Предпочтительным примером такой методики является технология представления PROfusion, используемая в Примерах (см. ниже).

В другом подходе, антитела согласно изобретению могут быть также получены <sup>40</sup> методами дрожжевого представления, известными специалистам. В методах дрожжевого представления, для связывания доменов антител со стенками дрожжевых клеток и их представления на поверхности дрожжей применяются генетические методы. В частности, такие дрожжи могут быть использованы для представления антигенсвязывающих доменов, экспрессируемых из репертуара или комбинаторной библиотеки антител (например, человеческих или мышиных антител). Примерами методов дрожжевого представления, которые могут быть применены для получения антител согласно <sup>45</sup>

изобретению, являются методы, описанные в патенте США № 6699658 (Wittrup et al.), который вводится в настоящее описание посредством ссылки.

#### **В. Продуцирование рекомбинантных анти-DLL4 антител**

Антитела согласно изобретению могут быть продуцированы любыми методами,

- 5 известными специалистам. Так, например, экспрессию в клетках-хозяевах, где экспрессионный(е) вектор(ы), кодирующий(ие) тяжелую и легкую цепи, был(и) перенесен(ы) в указанную клетку-хозяина, осуществляют стандартными методами. Различные формы термина «трансфекция» охватывают широкий ряд методов, обычно применяемых для введения экзогенной ДНК в прокариотические или эукариотические клетки-хозяева,
- 10 например, электропорацию, осаждение фосфатом кальция, трансфекцию, опосредуемую DEAE-декстраном, и т.п. Хотя антитела согласно изобретению могут экспрессироваться в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах, однако, предпочтительной является экспрессия антител в эукариотических клетках, а наиболее предпочтительно, в клетках-хозяевах млекопитающих, поскольку такие эукариотические клетки (а в
- 15 частности, клетки млекопитающих) с большей вероятностью, чем прокариотические клетки, будут подвергаться слиянию и секретировать «правильно» уложенное и иммунологически активное антитело.

Предпочтительными клетками-хозяевами млекопитающих, используемыми для экспрессии рекомбинантных антител согласно изобретению, являются клетки яичника

- 20 китайского хомячка (клетки CHO) (включая клетки dhfr-CHO, описанные Urlaub и Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220 (1980)), используемые вместе с DHFR-селективным маркером, например, как описано Kaufman и Sharp *J.Mol. Biol.* 159: 601-621 (1982), клетки миеломы NSO, клетки COS и клетки SP2. После введения рекомбинантных экспрессионных векторов, содержащих гены антител, в клетки-хозяева млекопитающих,
- 25 антитела получают путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для экспрессии антитела в клетках-хозяевах или, более предпочтительно, секреции антитела в культуральную среду, в которой выращивают клетки-хозяева. Антитела могут быть выделены из культуральной среды стандартными методами очистки белков.

- 30 Клетки-хозяева могут быть также использованы для продуцирования функциональных фрагментов антитела, таких как Fab-фрагменты или молекулы scFv. Совершенно очевидно, что в объем настоящего изобретения входят варианты вышеописанных процедур. Так, например, может оказаться желательной трансфекция клеток-хозяев ДНК, кодирующей функциональные фрагменты легкой цепи и/или
- 35 тяжелой цепи антитела согласно изобретению. Техника рекомбинантных ДНК может быть также применена для удаления некоторых или всех ДНК, кодирующих легкую или тяжелую цепь или обе этих цепи, которые не являются необходимыми для связывания с представляющими интерес антителами. В объем термина «антитела согласно изобретению» также входят молекулы, экспрессируемые такими усеченными молекулами
- 40 ДНК. Кроме того, могут быть продуцированы бифункциональные антитела, в которых одна тяжелая цепь и одна легкая цепь представляют собой антитело согласно изобретению, а другие тяжелая и легкая цепи являются специфичными к антигену, не представляющему интерес с точки зрения настоящего изобретения, где указанный способ продуцирования осуществляют путем перекрестного сшивания антитела согласно
- 45 изобретению со вторым антителом стандартными химическими методами перекрестного сшивания.

В предпочтительной системе рекомбинантной экспрессии антитела или его антигенсвязывающей части согласно изобретению, рекомбинантный экспрессионный

вектор, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь антитела, встраивают в клетки dhfr-CHO методом трансфекции, опосредуемой фосфатом кальция. В рекомбинантном экспрессионном векторе гены тяжелой и легкой цепей антитела функционально присоединены к регуляторным элементам «энхансер CMV/промотор AdMLP», что 5 приводит к запуску транскрипции генов на высоком уровне. Рекомбинантный экспрессионный вектор также несет ген DHFR, что позволяет проводить отбор клеток CHO, трансфицированных вектором, путем их культивирования в присутствии метотрексата/амплификации. Отобранные трансформированные клетки-хозяева 10 культивируют для экспрессии тяжелой и легкой цепей антитела, и из культуральной среды выделяют интактное антитело. Для получения рекомбинантного экспрессионного вектора и для трансфекции клеток-хозяев, отбора трансформантов, культивирования клеток-хозяев и выделения антитела из культуральной среды применяют стандартные 15 методы молекулярной биологии. Настоящее изобретение также относится к способу синтеза рекомбинантного антитела согласно изобретению путем культивирования клеток-хозяев согласно изобретению в подходящей культуральной среде с получением рекомбинантного антитела согласно изобретению. Этот способ может также включать выделение рекомбинантного антитела из культуральной среды.

### 1. Анти-DLL4 антитела

Аминокислотные последовательности VH- и VL-областей выделенных полностью 20 человеческих антител, которые связываются с человеческим DLL4, представлены для клонов E9 и A10 в таблице 4 (см. ниже в разделе «Примеры»). Было установлено, что изолированные последовательности CDR анти-DLL4 антител E9 и A10 принадлежат к двум новым семействам DLL4-связывающих белков, выделенных в соответствии с настоящим изобретением, и содержат полипептиды, которые включают 25 последовательности CDR, происходящие от E9 и его аффинно зрелых клонов, и последовательности CDR, происходящие от A10 и его аффинно зрелых клонов. Вариабельные области и CDR моноклонального антитела E9 и его аффинно зрелых производных указаны в таблицах 4, 8, 14, 18 и 19. Вариабельные области и CDR моноклонального антитела A10 и его аффинно зрелых производных указаны в таблицах 30 4, 9 и 10. Для производства и для отбора CDR в целях получения связывающихся белков согласно изобретению, обладающих предпочтительной активностью связывания с DLL4 и/или нейтрализации DLL4, а именно человеческого DLL4, могут быть применены известные стандартные методы получения связывающихся белков согласно изобретению и оценки способности этих связывающихся белков связываться с DLL4 и/или 35 нейтрализовать их активность, включая, но не ограничиваясь ими, методы, конкретно описанные в настоящей заявке.

Исходя из результатов сопоставления аминокислотных последовательностей CDR вариабельных областей тяжелой цепи (VH) и вариабельных областей легкой цепи (VL) клонов анти-DLL4 антитела E9, описанных в настоящей заявке, был получен DLL4- 40 связывающий белок согласно изобретению, содержащий антигенсвязывающий домен, способный связываться с человеческим DLL4, где указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну или несколько CDR, выбранных из группы, состоящей из:

CDR-H1: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 99), где:

- 45 X<sub>1</sub> представляет собой S или N;  
 X<sub>2</sub> представляет собой S, G или N;  
 X<sub>3</sub> представляет собой S, N, T, G или R;

X<sub>4</sub> представляет собой Y;

X<sub>5</sub> представляет собой Y или H;

X<sub>6</sub> представляет собой W; и

X<sub>7</sub> представляет собой G;

CDR-H2: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub> (SEQ ID NO: 100),

где:

X<sub>1</sub> представляет собой D;

X<sub>2</sub> представляет собой I;

X<sub>3</sub> представляет собой Y, N или S;

X<sub>4</sub> представляет собой Y;

X<sub>5</sub> представляет собой T, N, A, I, S или R;

X<sub>6</sub> представляет собой G;

X<sub>7</sub> представляет собой S, N, T или G;

X<sub>8</sub> представляет собой T;

X<sub>9</sub> представляет собой Y;

X<sub>10</sub> представляет собой Y;

X<sub>11</sub> представляет собой N;

X<sub>12</sub> представляет собой P;

X<sub>13</sub> представляет собой S;

X<sub>14</sub> представляет собой L;

X<sub>15</sub> представляет собой K; и

X<sub>16</sub> представляет собой S, N, D или G;

CDR-H3: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub> (SEQ ID NO: 101), где:

X<sub>1</sub> представляет собой E, Y, F, Q, W, L или A;

X<sub>2</sub> представляет собой D, A, S, G, V, E или N;

X<sub>3</sub> представляет собой V, M, L, P или A;

X<sub>4</sub> представляет собой I, A, P, R, S, K, Q, V, G, M или E;

X<sub>5</sub> представляет собой L, Y, F или M;

X<sub>6</sub> представляет собой R, G, S, Q или A;

X<sub>7</sub> представляет собой G;

X<sub>8</sub> представляет собой G, A или S;

X<sub>9</sub> представляет собой S, A, L, V, R или G;

X<sub>10</sub> представляет собой D; и

X<sub>11</sub> представляет собой Y, D, S, N, H, E, R, L, P, C, I, M, T, Q или K;

CDR-L1: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub> (SEQ ID NO: 102), где:

X<sub>1</sub> представляет собой S;

X<sub>2</sub> представляет собой G;

X<sub>3</sub> представляет собой Q, E или D;

X<sub>4</sub> представляет собой R, S, G, M, K, L или T;

X<sub>5</sub> представляет собой L;

X<sub>6</sub> представляет собой G;

X<sub>7</sub> представляет собой D или E;

X<sub>8</sub> представляет собой K;

<sup>5</sup> X<sub>9</sub> представляет собой Y;

X<sub>10</sub> представляет собой A или V; и

X<sub>11</sub> представляет собой S;

CDR-L2: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 103), где:

<sup>10</sup> X<sub>1</sub> представляет собой E или Q;

X<sub>2</sub> представляет собой D;

X<sub>3</sub> представляет собой S, L, T, A, E или F;

X<sub>4</sub> представляет собой K, T, E, N, Q, S или M;

<sup>15</sup> X<sub>5</sub> представляет собой R;

X<sub>6</sub> представляет собой P; и

X<sub>7</sub> представляет собой S;

и

CDR-L3: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub> (SEQ ID NO: 104), где:

<sup>20</sup> X<sub>1</sub> представляет собой Q;

X<sub>2</sub> представляет собой A;

X<sub>3</sub> представляет собой W;

X<sub>4</sub> представляет собой D;

<sup>25</sup> X<sub>5</sub> представляет собой R, S, M, E, N, G или K;

X<sub>6</sub> представляет собой D или E;

X<sub>7</sub> представляет собой T, V, A, S или M;

X<sub>8</sub> представляет собой G, A или C; и

<sup>30</sup> X<sub>9</sub> представляет собой V.

Предпочтительно, DLL4-связывающий белок, содержащий одну или несколько вышеописанных CDR, связывается с человеческим («hu», «h») DLL4, а также с одним или несколькими белками DLL4, выбранными из группы, состоящей из мышиного («mu») DLL4, DLL4 яванского макака («суно») и крысиного DLL4.

<sup>35</sup> Исходя из результатов сопоставления аминокислотных последовательностей CDR вариабельных областей тяжелой цепи (VH) и вариабельных областей легкой цепи (VL) клонов анти-DLL4 антитела A10, описанных в настоящей заявке, был получен DLL4-связывающий белок согласно изобретению, содержащий антигенсвязывающий домен, способный связываться с человеческим DLL4, где указанный антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну или несколько CDR, выбранных из группы, состоящей из:

CDR-H1: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 105), где:

X<sub>1</sub> представляет собой S, N или D;

<sup>45</sup> X<sub>2</sub> представляет собой H или Y;

X<sub>3</sub> представляет собой W;

X<sub>4</sub> представляет собой M; и

X<sub>5</sub> представляет собой S или H;

CDR-H2: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub>-X<sub>17</sub> (SEQ ID NO: 106), где:

- X<sub>1</sub> представляет собой I, D, M или T;
- <sup>5</sup> X<sub>2</sub> представляет собой I;
- X<sub>3</sub> представляет собой S;
- X<sub>4</sub> представляет собой Y, N, S, Q, V, T, H или D;
- X<sub>5</sub> представляет собой D;
- <sup>10</sup> X<sub>6</sub> представляет собой G;
- X<sub>7</sub> представляет собой S, R, I, T, G, K, H или N;
- X<sub>8</sub> представляет собой N, Y, S, I или T;
- X<sub>9</sub> представляет собой K, M, N, Q, E, T, R, S, A или L;
- X<sub>10</sub> представляет собой Y, D или E;
- <sup>15</sup> X<sub>11</sub> представляет собой S или Y;
- X<sub>12</sub> представляет собой A;
- X<sub>13</sub> представляет собой D;
- X<sub>14</sub> представляет собой S;
- <sup>20</sup> X<sub>15</sub> представляет собой V;
- X<sub>16</sub> представляет собой K; и
- X<sub>17</sub> представляет собой G;

CDR-H3: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub> (SEQ ID NO: 107), где:

- <sup>25</sup> X<sub>1</sub> представляет собой A;
- X<sub>2</sub> представляет собой G, A или R;
- X<sub>3</sub> представляет собой G;
- X<sub>4</sub> представляет собой G, S или A;
- <sup>30</sup> X<sub>5</sub> представляет собой N;
- X<sub>6</sub> представляет собой V или M;
- X<sub>7</sub> представляет собой G;
- X<sub>8</sub> представляет собой F, L, Y или M;
- <sup>35</sup> X<sub>9</sub> представляет собой D; и
- X<sub>10</sub> представляет собой I, S или L;

CDR-L1: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub> (SEQ ID NO: 108), где:

- X<sub>1</sub> представляет собой S;
- <sup>40</sup> X<sub>2</sub> представляет собой A или G;
- X<sub>3</sub> представляет собой D;
- X<sub>4</sub> представляет собой K, N, L, Q, M, E, S, T, G или D;
- X<sub>5</sub> представляет собой L;
- <sup>45</sup> X<sub>6</sub> представляет собой G;
- X<sub>7</sub> представляет собой T, S, N, A, G или E;
- X<sub>8</sub> представляет собой K, Q, N или R;
- X<sub>9</sub> представляет собой Y;

X<sub>10</sub> представляет собой V или I; и

X<sub>11</sub> представляет собой S;

CDR-L2: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 109), где:

<sup>5</sup> X<sub>1</sub> представляет собой Q;

X<sub>2</sub> представляет собой D;

X<sub>3</sub> представляет собой A, G, W, S или D;

X<sub>4</sub> представляет собой K, M, Q, N, L, T, I или E;

<sup>10</sup> X<sub>5</sub> представляет собой R;

X<sub>6</sub> представляет собой P;

X<sub>7</sub> представляет собой S; и

CDR-L3: X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub> (SEQ ID NO: 110), где:

<sup>15</sup> X<sub>1</sub> представляет собой Q;

X<sub>2</sub> представляет собой S или A;

X<sub>3</sub> представляет собой W;

X<sub>4</sub> представляет собой D;

<sup>20</sup> X<sub>5</sub> представляет собой R, S, Q, P, A, V, W или M;

X<sub>6</sub> представляет собой S, G, I, N, R или T;

X<sub>7</sub> представляет собой D или G;

X<sub>8</sub> представляет собой V, A, P или E; и

X<sub>9</sub> представляет собой V.

<sup>25</sup> Предпочтительно, DLL4-связывающий белок, содержащий одну или несколько вышеописанных CDR, связывается с человеческим («hu») DLL4, а также с DLL4 яванского макака («супо»).

## 2. Химерные анти-DLL4 антитела

<sup>30</sup> Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой различные части

антитела происходят от животных различных видов, и такое антитело имеет вариабельную область, происходящую от мышного моноклонального антитела, и константную область человеческого иммуноглобулина. См., например, Morrison, *Science*, 229: 1202-1207 (1985); Oi et al., *BioTechniques*, 4: 214 (1986); Gillies et al., *J. Immunol. Methods*, 125: 191-202 (1989); патенты США №№ 5807715, 4816567 и 4816397, которые во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки. Кроме того, могут быть применены методы продуцирования «химерных антител» путем сплайсинга генов молекулы мышного антитела, обладающей соответствующей специфичностью к антигену, вместе с генами молекулы человеческого антитела, обладающей соответствующей биологической активностью. См., например, публикации Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984); Neuberger et al., *Nature*, 312: 604-608 (1984); Takeda et al., *Nature*, 314: 452-454 (1985), которые во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

## 3. CDR-привитые анти-DLL4 антитела

<sup>45</sup> Изолированные последовательности CDR анти-DLL4 антитела согласно изобретению могут быть использованы для получения CDR-привитых антител в целях модуляции свойств исходного антитела. Такими свойствами являются, но не ограничиваются ими, кинетика связывания, аффинность, биологическая активность, видовая перекрестная реактивность, молекулярная видовая перекрестная реактивность, эпитоп, физико-

химические свойства, фармакокинетические свойства, фармакодинамические свойства или фармакологические свойства. CDR-привитые антитела содержат последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей, происходящие от человеческого антитела или антитела приматов, не являющихся человеком, где одна или несколько областей 5 CDR цепи VH и/или VL заменены CDR-последовательностями исходного анти-DLL4 антитела. Каркасная последовательность, происходящая от любого человеческого антитела или антитела приматов, не являющихся человеком, может служить в качестве матрицы для присоединения CDR. Однако замена прямой цепи на такую каркасную последовательность часто приводит к некоторой потери аффинности связывания с 10 антигеном. Чем больше гомология человеческого антитела или антитела животного другого вида с исходным человеческим антителом, тем меньше вероятность того, что объединение CDR с новой человеческой каркасной областью или каркасной областью приматов, не являющихся человеком, будет вносить изменения в CDR, приводящие к снижению аффинности или к ухудшению других свойств. Поэтому, предпочтительно, 15 чтобы вариабельная каркасная область, выбранная для замены человеческой вариабельной каркасной области, не включая CDR, была по меньшей мере на 30% идентична каркасной вариабельной области человеческого антитела. Более предпочтительно, чтобы вариабельная каркасная область, выбранная для замены человеческой вариабельной каркасной области, не включая CDR, была по меньшей 20 мере на 40% идентична каркасной вариабельной области человеческого антитела. Более предпочтительно, чтобы вариабельная каркасная область, выбранная для замены человеческой вариабельной каркасной области, не включая CDR, была по меньшей мере на 50% идентична каркасной вариабельной области человеческого антитела. Более предпочтительно, чтобы вариабельная каркасная область, выбранная для замены 25 человеческой вариабельной каркасной области, не включая CDR, была по меньшей мере на 60% идентична каркасной вариабельной области человеческого антитела. Более предпочтительно, чтобы новая каркасная область вариабельной области человека или приматов, не являющихся человеком, и исходная человеческая вариабельная каркасная область, не включая CDR, имели последовательности, идентичные по меньшей мере на 30%. Более предпочтительно, чтобы новая каркасная область вариабельной области человека или приматов, не являющихся человеком, и исходная человеческая вариабельная каркасная область, не включая CDR, имели последовательности, идентичные по меньшей мере на 75%. И наиболее предпочтительно, чтобы новая каркасная область вариабельной области человека или приматов, не являющихся 35 человеком, и исходная человеческая вариабельная каркасная область, не включая CDR, имели последовательности, идентичные по меньшей мере на 80%. Даже при использовании в высокой степени гомологичных каркасных человеческих последовательностей и последовательностей приматов, не являющихся человеком, для присоединения к CDR исходного человеческого анти-DLL4 антитела, полученное 40 привитое антитело может до некоторой степени терять аффинность связывания с антигеном. В этом случае, для восстановления аффинности необходимо включить по меньшей мере одну или несколько замен ключевых каркасных остатков исходного антитела в соответствующее положение полученного привитого антитела. Такой ключевой остаток может быть выбран из группы, состоящей из:

45      остатка, смежного с CDR;  
       остатка сайта гликозилирования;  
       редкого остатка;  
       остатка, способного взаимодействовать с человеческим DLL4;

канонического остатка;

остатка, расположенного в зоне контактирования вариабельной области тяжелой цепи с вариабельной областью легкой цепи;

остатка в зоне Верньера; и

- 5 остатка в области, которая перекрывается с областью CDR1 вариабельной тяжелой цепи, определенной по Чотиа, и с первой каркасной областью тяжелой цепи, определенной по Кэбату.

#### 4. Гуманизированные анти-DLL4 антитела

Хотя для композиций согласно изобретению не требуется получения

- 10 гуманизированных антител, однако, такие гуманизированные анти-DLL4 антитела могут быть получены с использованием композиций согласно изобретению.

Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антител, происходящие от антител нечеловеческих видов, которые связываются с нужным антигеном, и имеют одну или несколько гипервариабельных областей (CDR), происходящих от

- 15 нечеловеческих видов, и каркасные области молекулы человеческого иммуноглобулина. Известные последовательности человеческих Ig описаны, например, в интернете на web-сайтах ([www](http://www).), например, [ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi](http://ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi);

[atcc.org/phage/hdb.html](http://atcc.org/phage/hdb.html);

[sciquest.com/](http://sciquest.com/);

20 [abcam.com/](http://abcam.com/);

[antibodyresource.com/onlinecomp.html](http://antibodyresource.com/onlinecomp.html);

[public.iastate.edu/.about.pedro/research\\_tools.html](http://public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html);

[mgen.uniheidelberg.de/SD/IT/IT.html](http://mgen.uniheidelberg.de/SD/IT/IT.html);

[whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm](http://whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm);

25 [library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html](http://library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html);

[hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/](http://hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/);

[path.-cam.ac.Uk/.about.mrc7/mikeimages.html](http://path.-cam.ac.Uk/.about.mrc7/mikeimages.html);

[antibodyresource.com/](http://antibodyresource.com/);

[mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html](http://mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html);

30 [immunologylink.com/](http://immunologylink.com/);

[pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html](http://pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html);

[biotech.ufl.edu/.about.hcl/](http://biotech.ufl.edu/.about.hcl/);

[pebio.com/pa/340913-/340913.html](http://pebio.com/pa/340913-/340913.html);

[nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/](http://nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/);

35 [m.ehimeu.ac.jp/.about.yasuhito/Elisa.html](http://m.ehimeu.ac.jp/.about.yasuhito/Elisa.html);

[biodesign.com/table.asp](http://biodesign.com/table.asp);

[icnet.uk/axp/facs/davies/lin-ks.html](http://icnet.uk/axp/facs/davies/lin-ks.html);

[biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html](http://biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html);

[isac-net.org/sites\\_geo.html](http://isac-net.org/sites_geo.html);

40 [aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html](http://aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html);

[baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html](http://baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html);

[recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/](http://recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/);

[mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html](http://mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html);

[ibt.unam.mx/vir/V\\_mice.html](http://ibt.unam.mx/vir/V_mice.html);

45 [imgt.cnusc.fr:8104/](http://imgt.cnusc.fr:8104/);

[biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html](http://biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html);

[antibody.bath.ac.uk/](http://antibody.bath.ac.uk/);

[abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html](http://abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html);

- unizh.ch/.about.honegger/AHO-seminar/Slide01.html;  
 cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/;  
 nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;  
 path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/ТАННРhtml;  
 5 ibt.unam.mx/vir/structure/stat\_aim.html;  
 biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;  
 cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Webpages/Pept/spot-tech.html;  
 jerini.de/frproducts.htm;  
 patents.ibm.com/ibm.html, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S.  
 10 Dept. Health (1983), которые во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки. Такие «импортные» последовательности могут быть использованы для снижения иммуногенности или для снижения, усиления или модификации связывания, аффинности, скорости ассоциации, скорости диссоциации, авидности, специфичности, времени полужизни или любых других подходящих свойств, известных специалистам.  
 15 Каркасные остатки в человеческих каркасных областях могут быть заменены соответствующим остатком донорного антитела с CDR в целях изменения, например, улучшения связывания с антигеном. Такие каркасные замены идентифицируют методами, хорошо известными специалистам, например, путем моделирования взаимодействий CDR и каркасных остатков в целях идентификации каркасных остатков, играющих  
 20 важную роль в связывании с антигеном, и сравнения последовательностей в целях идентификации редко встречающихся каркасных остатков в конкретных положениях. (См., например, патент США № 5585089 (Queen et al.); и публикацию Riechmann et al., *Nature* 332: 323-327 (1988), которые во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки). Трехмерные модели иммуноглобулинов являются  
 25 общедоступными и известны специалистам в данной области. Существуют компьютерные программы, которые иллюстрируют и представляют вероятные трехмерные конформационные структуры выбранных последовательностей-кандидатов иммуноглобулина. Анализ таких представлений позволяет определить вероятную роль этих остатков в функционировании последовательности-кандидата иммуноглобулина,  
 30 то есть выявить остатки, влияющие на способность иммуноглобулина-кандидата связываться с антигеном. Таким образом, остатки FR могут быть выбраны из консенсусных последовательностей и «импортных» последовательностей и объединены так, чтобы получить антитело с желаемыми свойствами, такими как повышенная аффинность по отношению к антигену(ам)-мишени(ям). В общих чертах, остатки CDR  
 35 непосредственно и в самой высокой степени влияют на связывание с антигеном. Антитела могут быть гуманизированы различными методами, известными специалистам, такими как, но не ограничивающимися ими, методы, описанные в публикациях Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Verhoeven et al., *Science* 239: 1534-1536 (1988), Sims et al., *J. Immunol.* 151: 2296-2308 (1993); Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-907 (1987),  
 40 Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 4285-4289 (1992); Presta et al., *J. Immunol.* 151: 2623-2632 (1993), Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5): 489-498 (1991); Studnicka et al., *Protein Engineering* 7(6): 805-814 (1994); Roguska E.A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 969-973 (1994); в публикации РСТ №№ WO 91/09967, WO 99/06834 (РСТ/US98/16280), WO 97/20032 (РСТ/US96/18978), WO 92/11272 (РСТ/US91/09630), WO 92/03461 (РСТ/US91/45 05939), WO 94/18219 (РСТ/US94/01234), WO 92/01047 (РСТ/GB91/01134), WO 93/06213 (РСТ/GB92/01755), WO 90/14443, WO 90/14424 и WO 90/14430; в публикациях Европейских патентных заявок №№ EP059106, EP0519596 и EP0239400; в патентах США №№ 5565332, 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023,

6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539 и 4816567, которые во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки, включая цитируемые там работы.

#### **С. Получение антител и антитело-продуцирующих клеточных линий**

Анти-DLL4 антитела согласно изобретению предпочтительно обладают высокой

способностью снижать или нейтрализовать активность опухолей в отношении аngиогенеза, оцениваемую, например, с помощью любого из нескольких существующих анализов *in vitro* и *in vivo*, известных специалистам. Оценка нейтрализации активности DLL4 может быть проведена с помощью нескольких *in vitro* и *in vivo* анализов, известных специалистам. Репрезентативными параметрами для оценки нейтрализации активности

DLL4 являются, но не ограничиваются ими, антитела, которые ингибируют взаимодействие DLL4 с рецептором Notch и/или путь передачи сигнала Notch при величинах IC<sub>50</sub>, составляющих примерно по меньшей мере 10<sup>-6</sup> М, по меньшей мере 10<sup>-7</sup> М или по меньшей мере 10<sup>-8</sup> М.

Предпочтительно, анти-DLL4 антитела согласно изобретению также обладают высокой способностью снижать или нейтрализовать активность DLL4.

В предпочтительных вариантах изобретения изолированное антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с человеческим DLL4, где указанное антитело или его антигенсвязывающая часть диссоциируется из человеческого DLL4 с константой скорости диссоциации K<sub>off</sub> примерно 0,1 с<sup>-1</sup> или менее, как было определено методом поверхностного плазмонного резонанса, или ингибирует DLL4 и/или активность человеческого DLL4 с IC<sub>50</sub> примерно 1×10<sup>-6</sup> М или менее. Альтернативно, указанное антитело или его антигенсвязывающая часть могут диссоциироваться из человеческого DLL4 с константой скорости диссоциации K<sub>off</sub> примерно 1×10<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup> или менее, как было определено методом поверхностного плазмонного резонанса, или могут ингибировать человеческий DLL4 и/или активность человеческого DLL4 с IC<sub>50</sub> примерно 1×10<sup>-7</sup> М или менее. Альтернативно, указанное антитело или его антигенсвязывающая часть могут диссоциироваться из человеческого DLL4 с константой скорости диссоциации K<sub>off</sub> примерно 1×10<sup>-3</sup> с<sup>-1</sup> или менее, как было определено методом поверхностного плазмонного резонанса, или могут ингибировать человеческий DLL4 с IC<sub>50</sub> примерно 1×10<sup>-8</sup> М или менее. Альтернативно, указанное антитело или его антигенсвязывающая часть могут диссоциироваться из человеческого DLL4 с константой скорости диссоциации K<sub>off</sub> примерно 1×10<sup>-4</sup> с<sup>-1</sup> или менее, как было определено методом поверхностного плазмонного резонанса, или могут ингибировать активность человеческого DLL4 с IC<sub>50</sub> примерно 1×10<sup>-9</sup> М или менее. Альтернативно, указанное

антитело или его антигенсвязывающая часть могут диссоциироваться из человеческого DLL4 с константой диссоциации K<sub>off</sub> примерно 1×10<sup>-5</sup> с<sup>-1</sup> или менее, как было определено методом поверхностного плазмонного резонанса, или могут ингибировать DLL4 и/или активность человеческого DLL4 с IC<sub>50</sub> примерно 1×10<sup>-10</sup> М или менее. Альтернативно, указанное антитело или его антигенсвязывающая часть могут диссоциироваться из человеческого DLL4 с константой скорости диссоциации K<sub>off</sub> примерно 1×10<sup>-5</sup> с<sup>-1</sup> или менее, как было определено методом поверхностного плазмонного резонанса, или

Стр.: 74

могут ингибировать DLL4 и/или активность человеческого DLL4 с IC<sub>50</sub> примерно 1×10<sup>-11</sup> М или менее.

В некоторых вариантах изобретения антитело содержит константную область тяжелой цепи, такую как константная область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD. Предпочтительно, константная область тяжелой цепи представляет собой константную область тяжелой цепи IgG1 или константную область тяжелой цепи IgG4. Кроме того, указанное антитело может содержать константную область легкой цепи, то есть либо константную область легкой цепи каппа, либо константную область легкой цепи лямбда. Предпочтительно, указанное антитело содержит константную область легкой цепи каппа. Альтернативно, часть антитела может представлять собой, например, Fab-фрагмент или одноцепочечный Fv-фрагмент.

Замены аминокислотных остатков в Fc-части, вводимые для изменения эффекторной функции антитела, известны специалистам (см. патенты США №№ 5648260 и 5624821 (Winter, et al.). Fc-часть антитела опосредует несколько важных эффекторных функций, например, индуцирование цитокинов, ADCC, фагоцитоз, комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), время полужизни/скорость клиренса антитела и образование комплексов антиген-антитело. В некоторых случаях желательно, чтобы терапевтическое антитело обладало этими эффекторными функциями, но в других случаях, в зависимости от терапевтического применения, такие функции могут быть необязательными или даже нежелательными. Некоторые изотипы человеческих IgG, а в частности, IgG1 и IgG3, опосредуют ADCC и CDC посредством связывания с Fc $\gamma$ R и с комплементом C1q, соответственно. Fc-рецепторы у новорожденных (FcRn) представляют собой важные компоненты, определяющие время полужизни антител в кровотоке. В другом варианте изобретения по меньшей мере один аминокислотный остаток в константной области антитела, например, в Fc-области антитела, заменяют так, чтобы это приводило к изменению эффекторных функций антитела.

В одном из вариантов настоящее изобретение относится к меченому связывающему белку, где указанные антитело или часть антитела согласно изобретению дериватизированы другой функциональной молекулой (например, другим пептидом или белком), или связаны с такой молекулой. Так, например, меченный связывающий белок согласно изобретению может быть дериватизирован путем функционального присоединения антитела или части антитела согласно изобретению (путем химического взаимодействия, генетического слияния, нековалентного связывания или т.п.) к одной или нескольким другим молекулам, таким как другое антитело (например, биспецифическое антитело или диантитело), детектируемый агент, цитотоксическое средство, фармацевтическое средство и/или белок или пептид, которые могут опосредовать связывание антитела или его части с другой молекулой (такой как коровая область стрептавидина или полигистидиновая метка).

Подходящими детектируемыми агентами, которыми может быть дериватизировано антитело или часть антитела согласно изобретению, являются флуоресцентные соединения. Репрезентативными детектируемыми флуоресцентными соединениями являются флуоресцеин, флуоресцеин-изотиоцианат, родамин, 5-диметиламин-1-нафтилинсульфонилхлорид, фикоэрритрин и т.п. Антитело может быть также дериватизировано детектируемыми ферментами, такими как щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена, глюкоза-оксидаза и т.п. Если антитело дериватизировано детектируемым ферментом, то он может быть детектирован путем добавления вспомогательных реагентов, которые используются ферментом для продуцирования детектируемого реакционного продукта. Так, например, если таким детектируемым

агентом является пероксидаза хрена, то добавление пероксида водорода и диаминобензидина приводит к образованию окрашенного реакционного продукта, который является детектируемым. Антитело может быть также дериватизировано биотином и детектировано путем непрямого измерения уровня связывания с авидином

или стрептавидином.

В другом варианте настоящее изобретение относится к кристаллизованному DLL4-связывающему белку. В предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к кристаллам описанных здесь DLL4-связывающих белков, включая полноразмерные анти-DLL4 антитела, их фрагменты, а также конструкции антител и конъюгаты

связывающих белков (включая конъюгаты антител), описанные в настоящей заявке, и к составам и композициям, содержащим такие кристаллы. В одном из вариантов изобретения кристаллизованный связывающий белок имеет более длительное время полужизни *in vivo*, чем его растворимый аналог. В другом варианте изобретения связывающий белок сохраняет биологическую активность после кристаллизации.

Кристаллизованные связывающие белки согласно изобретению могут быть получены методами, известными специалистам и описанными в публикации заявки РСТ WO 02/72636, которая вводится в настоящее описание посредством ссылки.

В другом варианте настоящее изобретение относится к гликозилированному связывающему белку, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержат один

или несколько углеводных остатков. Растущая цепь белка при его продуцировании *in vivo* может затем подвергаться процессингу, известному как посттрансляционная модификация. В частности, сахарные (гликозильные) остатки могут быть присоединены ферментативно, способом, известным как гликозилирование. Полученные белки, несущие ковалентно связанные олигосахаридные боковые цепи, известны как

гликозилированные белки или гликопротеины. Гликозилирование белка зависит от представляющей интерес аминокислотной последовательности белка, а также от типа клетки-хозяина, в которой экспрессируется такой белок. Различные организмы могут продуцировать различные гликозилирующие ферменты (например, гликозилтрансферазы и гликозидазы) и имеют различные доступные субстраты (нуклеотидные сахара).

Благодаря таким факторам характер гликозилирования белка и состав гликозильных остатков могут варьировать в зависимости от системы хозяина, в которой экспрессируется конкретный белок. Гликозильными остатками, используемыми в настоящем изобретении, являются, но не ограничиваются ими, остатки глюкозы, галактозы, маннозы, фукозы, N-ацетилглюкозамина и сиаловой кислоты.

Предпочтительно, гликозилированный связывающий белок содержит гликозильные остатки, имеющие характер гликозилирования, наблюдаемый у человека.

Специалисту в данной области известно, что изменение характера гликозилирования белка может приводить к изменению свойств белка. Так, например, эффективность терапевтического белка, продуцированного в микроорганизме-хозяине, таком как

дрожжи, и гликозилированного по эндогенному дрожжевому пути, может быть ниже, чем эффективность того же самого белка, экспрессируемого в клетках млекопитающих, таких как клеточная линия СНО. Такие гликопротеины могут быть также иммуногенными для человека и имеют уменьшенное время полужизни *in vivo* после введения. Специфические рецепторы у человека и других животных могут распознавать

специфические гликозильные остатки и стимулировать быстрое выведение белка из кровотока. Другими побочными эффектами могут быть изменение укладки белка, его растворимости, чувствительности к протеазам, переноса, транспорта, компартментализации, секреции, распознавания другими белками или факторами, а

также антигенностями или аллергенностью. В соответствии с этим, практический врач может выбрать терапевтический белок, имеющий конкретный состав и характер гликозилирования, например, белок, в котором состав и характер гликозилирования идентичны или по меньшей мере аналогичны составу или характеру гликозилирования 5 белка, продуцированного в человеческих клетках или в видоспецифических клетках рассматриваемого животного.

Экспрессия гликозилированных белков, отличающихся от белков клеток-хозяев, может быть достигнута путем генетической модификации клеток-хозяев, осуществляющей так, чтобы эти клетки-хозяева экспрессировали гетерологичные гликозилирующие 10 ферменты. С применением известной техники специалист-практик может самостоятельно получить антитела или их антигенсвязывающие части, имеющие характер гликозилирования, присущий человеческому белку. Так, например, дрожжевые штаммы были генетически модифицированы в целях экспрессии неприродных гликозилирующих 15 ферментов, так, чтобы гликозилированные белки (гликопротеины), продуцируемые в этих дрожжевых штаммах, имели характер гликозилирования белка, идентичный характеру гликозилирования, присущему клеткам животных, а в частности, человеческим 20 клеткам (см. публикации заявок на патент США №№ 2004/0018590 и 2002/0137134).

Кроме того, для специалиста в данной области очевидно, что представляющий 25 интерес белок может быть экспрессирован с использованием библиотеки клеток-хозяев, генетически сконструированных в целях осуществления экспрессии различных гликозилирующих ферментов, для того чтобы члены библиотеки клеток-хозяев продуцировали представляющий интерес белок, имеющий измененный характер гликозилирования. Специалист-практик может затем самостоятельно выбрать и выделить представляющий интерес белок, имеющий конкретный новый характер 30 гликозилирования. При этом предпочтительно, чтобы белок, имеющий конкретно выбранный новый характер гликозилирования, обладал улучшенными или измененными биологическими свойствами.

#### **D. Применение DLL4-связывающих белков**

Учитывая способность связываться с человеческим DLL4 и с мышьяным DLL4, следует

30 отметить, что описанные здесь DLL4-связывающие белки, включая антитела и их части, могут быть использованы для детектирования или измерения уровня DLL4 в образце (например, в смеси, в растворе или в биологическом образце, таком как кровь, сыворотка или плазма) с помощью любого из стандартных иммуноанализов, известных специалистам, таких как твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA),

35 радиоиммуноанализ (РИА) или иммуногистохимический анализ ткани. Настоящее изобретение относится к способу детектирования человеческого DLL4 и/или мышьянского DLL4 в образце, где указанный способ включает контактирование образца с DLL4-связывающим белком и детектирование DLL4-связывающего белка, связанного с человеческим DLL4 и/или мышьяным DLL4, или несвязанного связывающего белка в 40 целях определения уровня человеческого DLL4 и/или мышьянского DLL4 в образце.

Описанный здесь DLL4-связывающий белок может быть прямо или опосредованно помечен детектируемым веществом для облегчения детектирования связанного или несвязанного DLL4-связывающего белка. Подходящими детектируемыми веществами являются различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные вещества,

45 люминесцентные вещества и радиоактивные вещества. Примерами подходящих ферментов являются пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза,  $\beta$ -галактозидаза или ацетилхолинэстераза; примерами подходящих комплексов с простетическими группами являются стрептавидин/биотин и avidin/биотин; примерами подходящих

флуоресцентных веществ являются умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин-изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин-флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; примером люминесцентного вещества является люминол, а примерами подходящих радиоактивных веществ являются  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  
<sup>5</sup>  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{166}\text{Ho}$  или  $^{153}\text{Sm}$ .

Биологическими образцами, которые могут быть оценены на DLL4, являются моча, фекалии, кровь, сыворотка, плазма, пот, слюна, мазок из ротовой полости (щечный мазок, мазок с языка или из зева), влагалищный мазок, мазок из прямой кишки, кожный мазок, соскоб с кожи, биоптат ткани, а также любой другой образец ткани, который может быть получен методами, известными специалистам.

Альтернативно мечению связывающего белка, человеческий DLL4 может быть проанализирован в биологических жидкостях с помощью конкурентного иммуноанализа, проводимого с использованием стандартных рекомбинантных человеческих (rh) DLL4, меченых детектируемым веществом, и описанного здесь немеченого DLL4-связывающего белка. В этом анализе, биологический образец, меченные rhDLL4-стандарты и DLL4-связывающий белок объединяют и определяют количество меченого rhDLL4-стандарта, связанного с немеченым связывающим белком. Количество человеческого DLL4 в биологическом образце обратно пропорционально количеству меченого rhDLL4-стандарта, связанного с DLL4-связывающим белком. Аналогичным образом, человеческий DLL4 может быть также проанализирован в биологических жидкостях с помощью конкурентного иммуноанализа, проводимого с использованием rhDLL4-стандартов, меченых детектируемым веществом, и описанного здесь немеченого DLL4-связывающего белка.

Предпочтительно, DLL4-связывающие белки согласно изобретению обладают способностью нейтрализовать активность DLL4, а в частности, активность hDLL4, *in vitro* и *in vivo*. В соответствии с этим, такие связывающие белки согласно изобретению могут быть использованы для ингибирования активности DLL4, например, в клеточной культуре, содержащей DLL4, у человека или у других млекопитающих, у которых экспрессируются DLL4, перекрестно реагирующий со связывающим белком согласно изобретению. В одном из вариантов настоящее изобретение относится к способу ингибирования активности DLL4, где указанный способ включает контактирование DLL4 с анти-DLL4 антителом или его частью согласно изобретению с последующим ингибированием активности DLL4. Так, например, в клеточной культуре, содержащей или предположительно содержащей DLL4, антитело или его часть согласно изобретению могут быть добавлены в клеточную среду в целях ингибирования активности DLL4 в культуре.

В другом варианте настоящее изобретение относится к способу снижения активности DLL4 у индивидуума, и преимущественно у индивидуума, страдающего заболеванием или расстройством, ассоциированным с негативным воздействием DLL4 или активности DLL4. Настоящее изобретение относится к способам снижения уровня DLL4 или активности DLL4 у индивидуума, страдающего указанным заболеванием или расстройством, где указанный способ включает введение индивидууму DLL4-связывающего белка согласно изобретению в целях снижения уровня DLL4 или активности DLL4 у индивидуума. Предпочтительно, DLL4 представляет собой человеческий DLL4, а указанным индивидуумом является человек. Альтернативно, таким индивидуумом может быть млекопитающее, экспрессирующее DLL4, с которым может связываться DLL4-связывающий белок согласно изобретению. Кроме того, таким индивидуумом может быть млекопитающее, которому был введен DLL4

(например, путем прямого введения DLL4 или посредством экспрессии DLL4-трансгена). Антитело или другой DLL4-связывающий белок согласно изобретению может быть введен человеку в терапевтических целях. Кроме того, DLL4-связывающий белок согласно изобретению может быть введен млекопитающему, не являющемуся человеком

5 и экспрессирующему DLL4, с которым может связываться указанный связывающий белок, где указанный белок вводят для лечения указанного животного, или используют для создания животного с моделью человеческого заболевания. В последнем случае такие животные-модели могут быть использованы для оценки терапевтической эффективности антител и других DLL4-связывающих белков согласно изобретению

10 (например, для тестирования доз и проведения курсов лечения путем введения указанного белка).

Используемый здесь термин «расстройство, ассоциированное с негативным воздействием DLL4 и/или с активностью передачи Notch-сигнала» включает такие заболевания, как рак и другие расстройства, при которых у индивидуумов, страдающих

15 указанным расстройством, наблюдается присутствие DLL4 и/или активность передачи Notch-сигнала, которые, как было установлено или как подозревается, ответственны за патофизиологию указанного расстройства или являются фактором, повышающим тяжесть данного расстройства. В соответствии с этим, расстройством, ассоциированным с негативным воздействием DLL4 и/или с активностью передачи Notch-сигнала, является

20 расстройство, при котором изменение уровня DLL4 и/или активности передачи Notch-сигнала, как предполагается, способствует ослаблению симптомов и/или прогрессирования указанного расстройства (например, роста опухоли). Такие расстройства могут проявляться такими признаками, как усиление ангиогенеза у индивидуума, страдающего указанным расстройством (например, увеличение

25 концентрации различных белков, известных специалистам, в сыворотке, в плазме, в синовиальной жидкости и т.п. у индивидуума в процессе роста и образования опухоли), где указанное усиление ангиогенеза может быть установлено, например, с использованием анти-DLL4 антитела, описанного выше. Неограничивающими

30 примерами расстройств, которые могут быть подвергнуты лечению с использованием антител согласно изобретению, являются расстройства, обсуждаемые в нижеследующем разделе, относящемся к фармацевтическим композициям антител согласно изобретению.

## **II. Фармацевтические композиции**

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим DLL4-связывающий белок согласно изобретению и фармацевтически

35 приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие DLL4-связывающие белки согласно изобретению, применяются в целях, но не ограничиваются ими, диагностики, детектирования или мониторинга расстройства, а также для предупреждения, лечения, устранения или снижения тяжести расстройства или одного или нескольких его симптомов, и/или в исследованиях. В конкретном варианте

40 изобретения композиция содержит один или несколько DLL4-связывающих белков согласно изобретению. В другом варианте изобретения фармацевтическая композиция содержит один или несколько связывающих белков согласно изобретению и один или несколько профилактических или терапевтических средств, не являющихся связывающими белками согласно изобретению и использующимися для лечения

45 расстройства, ассоциированного с негативным воздействием DLL4 и/или активности DLL4. Предпочтительно, профилактические или терапевтические средства, как известно, могут быть использованы, уже были использованы или используются в настоящее время для предупреждения, лечения, устранения или снижения тяжести расстройства,

например, рака или опухоли, или одного или нескольких их симптомов. В соответствии с этими вариантами указанная композиция может также содержать носитель, разбавитель или наполнитель.

Связывающие белки согласно изобретению могут быть включены в фармацевтические

- 5 композиции, подходящие для введения индивидууму. Обычно фармацевтическая композиция содержит DLL4-связывающий белок (или его DLL4-связывающую часть) согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, материал для покрытий, антибактериальные и противогрибковые
- 10 средства, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Примерами фармацевтически приемлемых носителей являются один или несколько компонентов, таких как вода, физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор, декстроза, глицерин, этиanol и т.п., а также их комбинации. Во многих случаях в указанную композицию
- 15 могут быть включены изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит и сорбит, или хлорид натрия. Фармацевтически приемлемые носители могут также содержать небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты или буферы, которые позволяют увеличивать срок хранения или эффективность антитела или его части.

- 20 Различные системы доставки известны специалистам и могут быть использованы для введения одного или нескольких DLL4-связывающих белков согласно изобретению или комбинаций одного или нескольких DLL4-связывающих белков согласно изобретению и профилактического или терапевтического средства, подходящего для предупреждения, лечения, устранения или снижения тяжести расстройства или одного
- 25 или нескольких его симптомов, например, для подавления ангиогенеза опухоли, где указанное введение осуществляют путем инкапсулирования в липосомы, в микрочастицы, в микрокапсулы, в рекомбинантные клетки, способные экспрессировать DLL4-связывающий белок; путем рецептор-опосредуемого эндоцитоза (см., например, Wu & Wu, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432 (1987)) и путем конструирования нуклеиновой
- 30 кислоты как части ретровирусного или другого вектора, и т.п. Методы введения профилактического или терапевтического средства согласно изобретению включают, но не ограничиваются ими, парентеральное введение (например, интраваскулярное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное и подкожное), эпидуральное введение, введение в опухоль и введение в слизистую (например, интраназальное и
- 35 пероральное введение). Кроме того, введение в легкие может быть осуществлено, например, с использованием ингалятора или аэрозольного распылителя и состава, содержащего аэрозоль-образующий агент. См., например, патенты США №№ 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 и 4880078; и публикации заявок PCT WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 и WO 99/66903, которые во
- 40 всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки. В одном из вариантов изобретения DLL4-связывающий белок согласно изобретению, средства для комбинированной терапии или композицию согласно изобретению вводят с применением технологии доставки лекарственного средства в легкие Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts, US). В конкретном варианте изобретения профилактические
- 45 или терапевтические средства согласно изобретению вводят внутримышечно, внутривенно, вовнутрь опухоли, перорально, интраназально, в легкие или подкожно. Профилактические или терапевтические средства могут быть введены любым стандартным способом, например, путем вливания или инъекции ударной дозы, путем

абсорбции через эпителиальную или кожно-слизистую выстилку (например, через слизистую ротовой полости, слизистую прямой кишки и тонкой кишки и т.п.), и могут быть также введены в комбинации с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным.

- 5 В конкретном варианте изобретения может оказаться желательным местное введение профилактических или терапевтических средств согласно изобретению в область, на которую направлено лечение; и это может быть достигнуто, например, такими способами, но не ограничивающимися ими, как местная инфузия, инъекция или введение имплантата, где указанный имплантат состоит из пористого или непористого материала,
- 10 включая мембранные и матрицы, такие как сиалистические мембранные, полимеры, волокнистый матрикс (например, Tissuel®), или коллагеновый матрикс. В одном из вариантов изобретения эффективное количество одного или нескольких DLL4-связывающих белков-антагонистов согласно изобретению вводят пациенту местно в пораженную область для предупреждения, лечения, устранения и/или снижения тяжести
- 15 расстройства или его симптомов. В другом варианте изобретения эффективное количество одного или нескольких DLL4-связывающих белков согласно изобретению вводят местно в пораженную область в комбинации с эффективным количеством одного или нескольких терапевтических средств (например, одного или нескольких профилактических или терапевтических средств), не являющихся связывающим белком
- 20 согласно изобретению и используемых для предупреждения, лечения, устранения и/или снижения тяжести расстройства или одного или нескольких его симптомов.

В другом варианте изобретения профилактическое или терапевтическое средство может быть доставлено в виде системы контролируемого высвобождения или системы замедленного высвобождения. В одном из вариантов изобретения для достижения

- 25 контролируемого или замедленного высвобождения может быть использован насос (см. Langer (*Science*, 249: 1527-1533 (1990)); Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.*, 14: 201-240 (1987); Buchwald et al., *Surgery*, 88: 507-516 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.*, 321: 574-579 (1989)). В другом варианте изобретения для обеспечения контролируемого или замедленного высвобождения терапевтических средств согласно изобретению могут
- 30 быть использованы полимерные материалы (см. например, Goodson, J. M., *In Medical Applications of Controlled Release. Vol. II. Applications and Evaluations*. (Langer and Wise, eds.), (CRC Press Inc., Boca Raton, 1984), chapter 6, pages 115-138; *Controlled Drug Bioavailability. Drug Product Design and Performance*. Smolen and Ball (eds.) (Wiley, New York, 1984); Langer and Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev Macromol. Chem. Phys.*, C23: 61-126 (1983);
- 35 см. также Levy et al., *Science*, 228: 190-192 (1985); During et al., *Ann. Neurol.*, 25: 351-356 (1989); Howard et al., *J. Neurosurg.*, 71: 105-112 (1989); патенты США №№ 5679377, 5916597, 5912015, 5989463 и 5128326; и публикации заявок PCT №№ WO 99/15154 и WO 99/20253. Примерами полимеров, используемых в составах замедленного высвобождения, являются, но не ограничиваются ими, поли(2-гидроксиэтилметакрилат),
- 40 полиметилметакрилат, полиакриловая кислота, сополимер этилена и винилацетата, полиметакриловая кислота, полигликолиды (ПЛГ), полиангидриды, поли-N-винилпирролидон, поливиниловый спирт, полиакриламид, полиэтиленгликоль, полилактиды (PLA), сополимеры лактида и гликолида (PLGA) и полиортогифиры. В одном из вариантов изобретения полимер, используемый в составе замедленного
- 45 высвобождения, является инертным, не содержит выщелачиваемых примесей, является стабильным при хранении, стерильным и биологически разлагаемым. В другом варианте изобретения система контролируемого или замедленного высвобождения может быть введена поблизости от профилактической или терапевтической мишени, для чего

потребуется лишь часть системной дозы (см., например, Goodson, Medical Applications of Controlled Release (1984), pages 115-138).

Системы контролируемого высвобождения обсуждаются в работе Langer (1990, *Science* 249: 1527-1533). Для получения составов замедленного высвобождения,

- 5 содержащих одно или несколько терапевтических средств согласно изобретению, может быть применен любой метод, известный специалистам в данной области. См., например, патент США № 4526938, публикации заявок PCT WO 91/05548 и WO 96/20698, Ning et al., «Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel» *Radiother. Oncol.*, 39: 179-189 (1996); Song et al., «Antibody Mediated Lung
- 10 Targeting of Long-Circulating Emulsions» *PDA J. Pharm. Sci. Tech.*, 50: 372-377 (1996); Cleek et al., «Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application» *Proceed. Intl. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*, 24: 853-854 (1997), и Lam et al., «Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery» *Proceed. Intl. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*: 24: 759-760 (1997), которые во всей своей
- 15 полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

В конкретном варианте изобретения, если композицией согласно изобретению является нуклеиновая кислота, кодирующая профилактическое или терапевтическое средство, то такая нуклеиновая кислота может быть введена *in vivo* для стимуляции экспрессии кодируемых ею профилактических или терапевтических средств, где

- 20 указанную нуклеиновую кислоту конструируют как часть соответствующего вектора, экспрессирующего нуклеиновую кислоту, и вводят таким образом, чтобы она проникала вовнутрь клетки, например, посредством ретровирусного вектора (см. патент США № 4980286), посредством прямой инъекции или посредством бомбардировки микрочастицами (например, с использованием «дробовика» для выстреливания генов;
- 25 Biostatic, Dupont), либо путем покрытия липидами, рецепторами клеточной поверхности или трансфицирующими агентами; либо путем ее включения в форму, связанной с гомеобокс-подобным пептидом, который, как известно, встраивается в ядро (см., например, Joliot et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1864-1868 (1991)). Альтернативно, нуклеиновая кислота может быть введена вовнутрь клетки и встроена в ДНК клетки-
- 30 хозяина для экспрессии посредством гомологичной рекомбинации.

Фармацевтическую композицию согласно изобретению получают в форме, совместимой с предполагаемым способом введения. Примерами способов введения являются, но не ограничиваются ими, парентеральное введение (например, внутривенное введение), интраваскулярное введение, подкожное введение, пероральное введение, интраназальное введение (например, путем ингаляции), трансдермальное введение (например, местное введение), введение через слизистую и ректальное введение. В конкретном варианте изобретения указанную композицию приготавливают рутинными методами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного, подкожного, внутримышечного, перорального, интраназального или местного введения 40 человеку. Обычно композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости, такая композиция может также включать солюбилизирующий агент и местный анестетик, такой как лигнокайн для облегчения боли на участке инъекции.

Если композиции согласно изобретению вводят местно, то они могут быть

- 45 приготовлены в виде мази, крема, чрескожного пластыря, лосьона, геля, шампуня, спрея, аэрозоля, раствора, эмульсии или другой формы, хорошо известной специалистам. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms. 19th ed. (Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1995). В этих целях обычно

используются лекарственные формы для местного введения, не являющиеся спреем, а также вязкие или полутвердые или твердые формы, содержащие носитель или один или несколько наполнителей, совместимых с местным введением и имеющих динамическую вязкость, превышающую динамическую вязкость воды. Подходящими составами

- 5 являются, но не ограничиваются ими, растворы, суспензии, эмульсии, кремы, жидкие мази, порошки, пастообразные мази, твердые мази и т.п., которые при необходимости могут быть стерилизованы или смешаны с вспомогательными агентами (например, с консервантами, стабилизаторами, смачивающими агентами, буферами или солями) для изменения различных свойств, таких как, например, осмотическое давление. Другими
- 10 подходящими лекарственными формами для местного введения являются распыляемые аэрозольные составы, в которых активный ингредиент, присутствующий в комбинации с твердым или жидким инертным носителем, упакован в виде смеси с летучими веществами под давлением (например, с газообразным пропеллером, таким как FREON®) или помещен в бутыль под давлением. В фармацевтические композиции и в
- 15 лекарственные формы могут быть добавлены, если это необходимо, увлажнители или смачивающие средства. Примеры таких дополнительных ингредиентов хорошо известны специалистам.

Если способ согласно изобретению включает интраназальное введение композиции, то такая композиция может быть приготовлена в форме аэрозоля, спрея, паров,

- 20 создающих туман, или в форме капель. В частности, профилактические или терапевтические средства, используемые в настоящем изобретении, могут быть легко доставлены в форме аэрозольного спрея из упаковок под давлением или аэрозольного ингалятора с использованием подходящего пропеллента (например, дихлордиформетана, трихлорфорторметана, дихлортетрафторэтана, диоксида углерода
- 25 или другого подходящего газа). В случае использования аэрозоля под давлением, унифицированная доза лекарственной формы может быть определена с помощью дозирующего клапана. Могут быть приготовлены капсулы и картриджи (состоящие, например, из желатина) для их использования в ингаляторе или в инсуффляторе, где
- 30 указанные капсулы и картриджи содержат порошкообразную смесь соединения и подходящей порошкообразной основы, такой как лактоза или крахмал.

Если способ согласно изобретению включает пероральное введение, то композиции для такого перорального введения могут быть приготовлены в форме таблеток, капсул, саше, гелевых капсул, растворов, суспензий и т.п. Таблетки или капсулы могут быть получены стандартными методами с использованием фармацевтически приемлемых наполнителей, таких как связывающие агенты (например, кукурузный крахмал в предварительной стадии желатинизации, поливинилпирролидон, или гидроксипропилметилцеллюлоза); наполнители (например, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза или бифосфат кальция); замасливатели (например, стеарат магния, тальк или двуокись кремния); дезинтеграторы (например, кукурузный крахмал или натрийсодержащий гликолят крахмала); или смачивающие агенты (например, лаурилсульфат натрия). На таблетки могут быть нанесены покрытия хорошо известными методами. Жидкие составы для перорального введения могут быть приготовлены в таких формах, но не ограничивающихся ими, как растворы, сиропы или суспензии, либо они могут быть получены в виде сухого продукта, который, перед его применением, может быть разведен водой или другим подходящим носителем. Такие жидкие составы могут быть получены стандартными методами с использованием фармацевтически приемлемых добавок, таких как суспендирующие агенты (например, сорбитоловый сироп, производные целлюлозы или гидрогенизированные пищевые

жиры); эмульгирующие агенты (например, лецитин или аравийская камедь); безводные носители (например, миндальное масло, эфиры масел, этиловый спирт или фракционированные растительные масла); и консерванты (например, метил- или пропил-<sup>5</sup> п-гидроксибензоаты или сорбиновая кислота). Эти составы могут также содержать

<sup>5</sup> забуферивающие соли, ароматизаторы, красители и подсластители, если это необходимо. Составы для перорального введения могут быть соответствующим образом приготовлены для достижения замедленного высвобождения, контролируемого высвобождения или замедленного высвобождения профилактического(их) или терапевтического(их) средства (средств).

<sup>10</sup> Способ согласно изобретению может включать введение композиции, приготовленной в комбинации с аэрозоль-образующим агентом, в легкие, например, с использованием ингалятора или аэрозольного распылителя. См., например, патенты США №№ 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 и 4880078; и публикации заявок РСТ №№ WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 и WO 99/66903, которые <sup>15</sup> во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки. В конкретном варианте изобретения, антитело согласно изобретению, средство для комбинированной терапии и/или композицию согласно изобретению вводят с применением технологии доставки лекарственного средства в легкие Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts, US).

<sup>20</sup> Способ согласно изобретению может включать введение композиции, приготовленной для парентерального введения путем инъекции (например, путем инъекции ударной дозы или непрерывного вливания). Композиции для инъекции могут быть приготовлены в унифицированной лекарственной форме (например, в ампулах или в контейнерах для многократного введения доз) с добавлением консерванта. Композиции могут быть <sup>25</sup> получены в таких формах, как супензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и могут содержать агенты для приготовления композиций, такие как супендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, активный ингредиент может быть приготовлен в порошкообразной форме, которая, перед ее применением, может быть разведена подходящим носителем (например, <sup>30</sup> стерильной апирогенной водой).

Способ согласно изобретению может также включать введение композиций, приготовленных в виде депо-составов. Такие составы замедленного действия могут быть введены путем имплантации (например, подкожно или внутримышечно) или путем внутримышечной инъекции. Так, например, композиции могут быть приготовлены с <sup>35</sup> использованием подходящих полимерных или гидрофобных материалов (например, в виде эмульсии в подходящем масле) или ионообменных смол, или в виде слаборастворимых производных (например, в виде слаборастворимой соли).

Способы согласно изобретению включают введение композиций, приготовленных в виде нейтральной или солевой формы. Фармацевтически приемлемыми солями <sup>40</sup> являются соли, образованные анионами, такими как анионы хлористоводородной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.п., и соли, образованные катионами, такими как катионы натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа(3), изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокaina и т.п.

Обычно ингредиенты композиций поставляются либо отдельно, либо в смеси в <sup>45</sup> унифицированной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметически запаянном контейнере, таком как ампула или саше с указанным количеством активного агента. Если способом введения является вливание, то композиция может быть расфасована по бутылям для

вливания раствора, содержащим стерильную воду фармацевтического качества или физиологический раствор. Если способом введения является инъекция, то ампулу со стерильной водой для инъекций или с физиологическим раствором приготавливают так, чтобы ингредиенты могли быть смешаны перед введением.

- 5 В частности, настоящее изобретение также относится к одному или нескольким профилактическим или терапевтическим средствам или к фармацевтическим композициям согласно изобретению, упакованным в герметически запаянnyй контейнер, такой как ампула или саше с указанным количеством активного агента. В одном из вариантов изобретения один или несколько профилактических или терапевтических
- 10 средств или фармацевтические композиции согласно изобретению поставляются в виде сухого лиофилизованного порошка или безводного концентрата в герметически запаянном контейнере, и могут быть разведены (например, водой или физиологическим раствором) до соответствующей концентрации, необходимой для введения индивидууму. Предпочтительно, одно или несколько профилактических или терапевтических средств
- 15 или фармацевтических композиций согласно изобретению поставляются в виде сухого стерильного лиофилизованного порошка в герметически запаянном контейнере в унифицированной дозе, составляющей по меньшей мере 5 мг, а более предпочтительно, по меньшей мере 10 мг, по меньшей мере 15 мг, по меньшей мере 25 мг, по меньшей мере 35 мг, по меньшей мере 45 мг, по меньшей мере 50 мг, по меньшей мере 75 мг или
- 20 по меньшей мере 100 мг. Лиофилизованные профилактические или терапевтические средства или фармацевтические композиции согласно изобретению должны храниться при 2°C-8°C в контейнере, в котором они были получены, и эти профилактические или терапевтические средства или фармацевтические композиции согласно изобретению должны быть введены через 1 неделю, а предпочтительно, через 5 дней, через 72 часа,
- 25 через 48 часов, через 24 часа, через 12 часов, через 6 часов, через 5 часов, через 3 часа или через 1 час после разведения. В альтернативном варианте изобретения один или несколько профилактических или терапевтических средств или фармацевтические композиции согласно изобретению поставляются в жидкой форме в герметически запаянном контейнере с указанным количеством и концентрацией агента.
- 30 Предпочтительно, композиция, вводимая в жидкой форме, поставляется в герметично запаянном контейнере в количестве, составляющем по меньшей мере 0,25 мг/мл, а более предпочтительно, по меньшей мере 0,5 мг/мл, по меньшей мере 1 мг/мл, по меньшей мере 2,5 мг/мл, по меньшей мере 5 мг/мл, по меньшей мере 8 мг/мл, по меньшей мере 10 мг/мл, по меньшей мере 15 мг/кг, по меньшей мере 25 мг/мл, по меньшей мере 50 мг/
- 35 мл, по меньшей мере 75 мг/мл или по меньшей мере 100 мг/мл. Такая жидкая форма должна храниться при 2°C-8°C в контейнере, в котором она была получена.

Связывающие белки согласно изобретению могут быть включены в фармацевтическую композицию, подходящую для парентерального введения.

- Предпочтительно, связывающий белок получают в виде раствора для инъекций,
- 40 содержащего 0,1-250 мг/мл антитела. Раствор для инъекций может состоять из жидкой или лиофилизированной лекарственной формы и находиться в сосуде из кремния или янтарной смолы, в ампуле или в предварительно заполненном шприце. Буфер может представлять собой L-гистидин (1-50 мМ), оптимально 5-10 мМ, при pH 5,0-7,0 (оптимальный pH 6,0). Другими подходящими буферами являются, но не ограничиваются
  - 45 ими, сукцинат натрия, цитрат натрия, фосфат натрия или фосфат калия. Хлорид натрия может быть использован для снижения токсичности раствора при концентрации 0-300 мМ (для жидкой лекарственной формы оптимальной является концентрация 150 мМ). В лиофилизированную лекарственную форму могут быть включены криозащитные

агенты, главным образом, 0-10% сахароза (оптимально, 0,5-1,0%). Другими подходящими криозащитными агентами являются трегалоза и лактоза. В

лиофилизованную лекарственную форму могут быть включены агенты, придающие объем, главным образом, 1-10% маннит (оптимально, 2-4%). В жидких и

5 лиофилизированных лекарственных формах могут использоваться стабилизаторы, главным образом, 1-50 mM L-метионина (оптимально, 5-10 mM). Другими подходящими агентами, придающими объем, являются глицин и аргинин, которые могут быть включены в виде 0-0,05% полисорбата-80 (оптимально, 0,005-0,01%). Дополнительными 10 поверхностно-активными веществами являются, но не ограничиваются ими, полисорбат 20 и поверхностно-активные вещества BRIJ.

Композиции согласно изобретению могут иметь различные формы. Такими формами являются, например, жидкые, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкые растворы (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или супспензии, таблетки, драже, порошки, липосомы и суппозитории. Выбор таких форм

15 зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения.

Типичными композициями являются композиции в форме растворов для инъекций или инфузий, такие как композиции, аналогичные композициям, используемым для пассивной иммунизации человека другими антителами. Выбранным способом введения является парентеральное введение (например, внутривенное, подкожное, внутрибрюшинное,

20 внутримышечное введение). В предпочтительном варианте изобретения описанный здесь DLL4-связывающий белок вводят путем внутривенного вливания или внутривенной инъекции. В другом предпочтительном варианте изобретения DLL4-связывающий белок вводят путем внутримышечной или подкожной инъекции.

Терапевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в

25 условиях их получения и хранения. Такая композиция может быть приготовлена в виде раствора, микрозмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для введения лекарственного средства в высокой концентрации. Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем введения активного соединения (то есть, антитела или его части) в нужном количестве в соответствующем растворителе

30 вместе с одним из перечисленных здесь ингредиентов или с их комбинациями, если это необходимо, с последующей стерилизацией путем фильтрации. Вообще говоря, дисперсии получают путем введения активного соединения в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из числа ингредиентов, перечисленных в настоящей заявке. В случае использования стерильных

35 лиофилизированных порошков для получения стерильных растворов для инъекций, такие порошки предпочтительно приготавливают из предварительно стерильно отфильтрованного раствора путем его вакуумной сушки и сушки распылением с получением порошка, содержащего активный ингредиент плюс любой дополнительный нужный ингредиент. Соответствующая текучесть раствора может поддерживаться,

40 например, с использованием покрытия, такого как лецитин, путем сохранения требуемого размера частиц в случае дисперсии, и с использованием поверхностно-активных веществ. Замедленная абсорбция композиций для инъекций может достигаться путем включения в данную композицию агента, замедляющего абсорбцию, например, моностеаратных солей и желатина.

45 DLL4-связывающие белки согласно изобретению могут быть введены различными методами, известными специалистам, хотя, в одном из вариантов изобретения, для многих терапевтических применений, предпочтительным путем/способом введения является подкожная инъекция, внутривенная инъекция или инфузия. Следует отметить,

что путь и/или способ введения варьируют в зависимости от желаемых результатов. В некоторых вариантах изобретения активное соединение может быть получено с использованием носителя, который будет защищать данное соединение от быстрого высвобождения, например, в виде состава с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, чрескожные пластыри и микроинкаспулированные системы доставки. Могут быть использованы биологически разлагаемые, биологически совместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортэфиры и полимолочная кислота. Многие методы получения таких составов запатентованы или, как правило, известны специалистам в данной области техники. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed. (Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

В некоторых вариантах изобретения связывающий белок согласно изобретению может быть введен перорально, например, вместе с инертным разбавителем или с легко усваиваемым пищевым носителем. Соединение (и другие ингредиенты, если это необходимо) может быть заключено в жесткие или мягкие желатиновые капсулы, спрессовано в таблетки или включено непосредственно в пищу индивидуума. Для перорального терапевтического введения соединения могут быть введены вместе с наполнителями и использованы в форме таблеток для проглатывания, подщечных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток и т.п. Для введения соединения согласно изобретению непарентеральными методами может оказаться необходимым нанесение на соединение покрытия из материала, предупреждающего его инактивацию, или совместное введение соединения с этим материалом.

В композиции могут быть также включены вспомогательные активные соединения. В некоторых вариантах изобретения связывающий белок согласно изобретению приготавливают и/или вводят вместе с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, которые могут быть использованы для лечения расстройств, ассоциированных с негативным воздействием активности DLL4. Так, например, анти-huDLL4 антитело или его часть согласно изобретению могут быть приготовлены и/или введены вместе с одним или несколькими дополнительными антителами, которые связываются с другими мишениями (например, с антителами, которые связываются с другими цитокинами или с молекулами клеточной поверхности). Кроме того, один или несколько связывающих белков согласно изобретению могут быть использованы в комбинации с двумя или более вышеупомянутыми терапевтическими средствами. В такой комбинированной терапии могут применяться преимущественно более низкие дозы вводимых терапевтических средств, что позволяет избежать возможной токсичности или осложнений, ассоциированных с различными монотерапиями.

В некоторых вариантах изобретения DLL4-связывающий белок согласно изобретению присоединяют к известному носителю, увеличивающему время полужизни этого белка. Такими носителями являются, но не ограничиваются ими, Fc-домен, полиэтиленгликоль и декстран. Такие носители описаны, например, в патенте США № 6660843 B1 и в опубликованной заявке PCT WO 99/25044, которые вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

В конкретном варианте изобретения методами генотерапии, проводимой в целях лечения, предупреждения, устранения или снижения тяжести расстройства или одного или нескольких его симптомов, являются введение нуклеотидных последовательностей нукleinовой кислоты, кодирующих связывающий белок согласно изобретению или другое профилактическое или терапевтическое средство согласно изобретению.

Генотерапия означает терапию, осуществляемую путем введения индивидууму экспрессированной или экспрессируемой нуклеиновой кислоты. В этом варианте изобретения нуклеиновые кислоты продуцируют кодируемые ими связывающий белок или профилактическое или терапевтическое средство согласно изобретению, которые опосредуют профилактический или терапевтический эффект.

В настоящем изобретении может быть применен любой из методов генотерапии, известных специалистам. Общий обзор этих методов генотерапии можно найти в публикациях Goldspiel et al., *Clin. Pharmacy*, 12: 488-505 (1993); Wu and Wu, *Biotherapy*, 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32: 573-596 (1993); Mulligan, *Science*, 260: 926-932 (1993); и Morgan and Anderson, *Ann. Rev. Biochem.*, 62: 191-217 (1993); Robinson, C, *Trends Biotechnol.*, 11(5): 155 (1993). Методы, хорошо известные специалистам в области техники рекомбинантных ДНК, можно найти в руководстве Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, New York, 1993); and Kriegler, *Gene Transfer and Expression. A Laboratory Manual*, (Stockton Press, New York, 1990). Подробное описание различных методов генотерапии приводится в публикации заявки на патент США № 20050042664 A1, которая вводится в настоящее описание посредством ссылки.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу терапии (например, лечения, ингибиования, ослабления симптомов, замедления или предотвращения развития или повторного появления или рецидива) или предупреждения развития DLL4-ассоциированной опухоли у индивидуума. Указанный способ включает введение индивидууму DLL4-связывающего белка, например, анти-DLL4 антитела или его фрагмента, описанных в настоящей заявке, в количестве, достаточном для лечения или предупреждения развития DLL4-ассоциированной опухоли или DLL4-ассоциированного ракового заболевания. Антагонист DLL4, то есть анти-DLL4 антитело или его фрагмент, может быть введен индивидууму отдельно или в комбинации с другими терапевтическими средствами, описанными в настоящей заявке.

DLL4 играет важную роль в развитии патологии, ассоциированной с рядом заболеваний, включая иммунные и воспалительные компоненты, а в частности, ангиогенез при раковом заболевании и опухоли. Примерами DLL4-ассоциированных расстройств являются, но не ограничиваются ими, расстройства, которые негативно влияют на нижеследующие биологические процессы: на функцию и развитие нервной системы; на стабилизацию артериальных эндотелиальных процессов и ангиогенез; на регуляцию основных клеточных взаимодействий между эндокардом и миокардом во время зарождения клапана и развития и дифференциации желудочек; на гомеостаз сердечного клапана, а также на процессы, вызывающие другие расстройства у человека, включая расстройства сердечно-сосудистой системы; временную дифференцировку клеточных линий эндокринного или экзокринного отдела поджелудочной железы; на выбор клеткой одного из двух путей линии дифференцировки, а именно выбор между секреторной и абсорбционной линиями дифференцировки в кишечнике; на увеличение компартмента гемопоэтических стволовых клеток в процессе развития кости и участие в коммитировании клеток в остеобластную линию дифференцировки, например, в процессе развития остеопороза; на регуляцию выбора клеткой пути дифференцировки в молочных железах на некоторых отдельных стадиях развития; и на определенные неядерные механизмы, такие как регуляция уровня актина в цитоскелете посредством тирозинкиназы Ab1. Более конкретно, DLL4-ассоциированными расстройствами являются, но не ограничиваются ими, рак, Т-ОЛЛ (Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз), CADASIL (церебральная аутосомно-доминантная артериопатия, ассоциированная с инфарктами в подкорковом слое и лейкоэнцефалопатией), PC

(рассеянный склероз), тетралогия Фалло и синдром Алажилля. Антитела и их антигенсвязывающие части, описанные в настоящей заявке, предпочтительно использовать для лечения рака и опухолей.

Связывающие белки согласно изобретению могут быть использованы отдельно или

5 в комбинации друг с другом, то есть более чем один описанный здесь DLL4-связывающий белок может быть использован для лечения рака, опухоли или другого расстройства, при которых, на здоровье индивидуума, наиболее благоприятный эффект оказывают связывание с DLL4, ингибирование DLL4 и/или нейтрализация DLL4, либо такой эффект может быть достигнут другими способами.

10 Следует отметить, что DLL4-связывающие белки согласно изобретению могут быть использованы отдельно или в комбинации с дополнительным агентом, например, с терапевтическим средством, где указанный дополнительный агент может быть выбран самим специалистом в зависимости от цели введения. Так, например, дополнительным агентом может быть терапевтическое средство, которое, как известно, может быть

15 использовано для лечения рака, опухоли или заболевания или состояния, при котором связывание с DLL4 или ингибирование DLL4 рассматривается как желательный или преимущественный фактор для лечения рака, опухоли или другого заболевания или состояния. Дополнительным агентом может быть также агент, который сообщает терапевтической композиции дополнительную эффективность, например, агент, который

20 улучшает вязкость композиции.

Следует также отметить, что комбинации согласно изобретению представляют собой комбинации, которые могут быть использованы в целях настоящего изобретения.

Средства, описанные ниже, приводятся лишь для иллюстрации и не ограничивают объема изобретения. Комбинациями, которые являются частью настоящего изобретения,

25 могут быть антитела согласно изобретению, вводимые в сочетании по меньшей мере с одним дополнительным агентом, выбранным из нижеприведенного списка.

Комбинация может также включать более чем один дополнительный агент, например, два или три дополнительных агента, если такой комбинацией является полученная композиция, которая может осуществлять нужные функции.

30 Предпочтительными комбинациями являются нестероидные противовоспалительные средства, также называемые НСПВС, которые включают лекарственные средства, подобные ибупрофену. Другими предпочтительными комбинациями являются кортикостероиды, включая преднизолон; при этом хорошо известные побочные эффекты используемых стероидов могут быть снижены или даже устранины путем уменьшения

35 дозы стероидов, используемых для лечения пациентов в комбинации с анти-DLL4 антителами согласно изобретению. Неограничивающими примерами терапевтических средств для лечения ревматоидного артрита, с которыми могут быть объединены антитело или его часть согласно изобретению, являются цитокин-ингибирующие противовоспалительные средства (ЦИПС); антитела или антагонисты против других

40 человеческих цитокинов или факторов роста, например, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, интерферонов, EMAP-II, GM-CSF, FGF и PDGF. Антитела согласно изобретению или их антигенсвязывающие части могут быть объединены с антителами против молекул клеточной поверхности, таких как CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA

45 или их лиганды включая CD154 (gp39 или CD40L).

Предпочтительные комбинации терапевтических средств могут влиять на различные участки путей передачи проонкогенного или проангидогенного сигнала.

Предпочтительными примерами терапевтических средств, которые могут быть

использованы в способах и композициях согласно изобретению, являются противоопухолевые средства, средства для лучевой терапии и химиотерапевтические средства, такие как ДНК-алкилирующие агенты, цисплатин, карбоплатин, антитубулиновые агенты, паклитаксел, доцетаксел, таксол, доксорубицин, гемцитабин, 5-гемзар, антрациклины, адриамицин, ингибиторы топоизомеразы I, ингибиторы топоизомеразы II, 5-фторурацил (5-FU), лейковорин, иринотекан, ингибиторы тирозинкиназных рецепторов (например, эрлотиниб, гефитиниб), ингибиторы COX-2 (например, целекоксиб) и ингибиторы киназы.

DLL4-связывающие белки согласно изобретению могут быть также объединены с

- 10 такими агентами, как метотрексат, 6-МР, азатиоприн, сульфасалазин, месалазин, олсалазин, хлорохинин/гидроксихлорохин, пеницилламин, ауротиомалат (вводимый внутримышечно и перорально), азатиоприн, колхицин, кортикостероиды (инъецируемые перорально, путем ингаляции и местно), агонисты адренорецептора бета-2 (альбутамол, тербуталин, сальметерал), ксантины (теофиллин, аминофиллин), кромогликат,
- 15 недокромил, кетотифен, ипратропий и окситропий, циклоспорин, FK506, рапамицин, миофенолят-мофетил, лефлуномид, НСПВС, например, ибупрофен, кортикостероиды, такие как преднизолон, ингибиторы фосфодиэстеразы, агонисты аденоцина, анти тромботические средства, ингибиторы комплемента, адренергические средства, агенты, блокирующие передачу сигнала провоспалительными цитокинами, такими как IL-1 (например, ингибиторы киназ IRAK, NIK, IKK, p38 или МАР), ингибиторы IL-1 $\beta$ - и TNF $\alpha$ -конвертирующих ферментов (ТАСЕ), ингибиторы Т-клеточных конвертирующих ферментов, ингибиторы передачи TNF $\alpha$ -сигнала, такие как ингибиторы киназы, ингибиторы металлопротеиназы, сульфасалазин, азатиоприн, 6-меркаптопурины, ингибиторы ангиотензин-конвертирующего фермента, растворимые рецепторы
- 20 цитокинов и их производные (например, растворимые рецепторы TNF p55 или p75 и производные p75TNFR IgG (Enbrel<sup>TM</sup> и p55TNFR IgG (Ленерцепт)), sIL-IRI, sIL-IRII, sIL-6R), противовоспалительные цитокины (например, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 и TGF $\beta$ ), целекоксиб, фолиевая кислота, сульфат гидроксихлорохина, рофекоксиб, этанерцепт, инфликсимаб, напроксен, валдекоксиб, сульфасалазин, метилпреднизолон, мелоксикам, 30 ацетат метилпреднизолона, тиомалат золота-натрия, аспирин, ацетонид триамцинолона, напсилат пропоксифена/АРАР, фолат, набуметон, диклофенак, пироксики, этодолак, диклофенак-натрий, оксапрозин, оксикодон-HCl, битартрат гидрокодона/АРАР, диклофенак натрий/мизопростол, фентанил, анагинра, человеческий рекомбинантный трамадол-HCl, салсалат, сулиндак, цианокобаламин/fa/пиридоксин, ацетаминофен,
- 35 аллендронат натрий, преднизолон, сульфат морфина, гидрохлорид лидокаина, индометацин, сульфат глюкозамина/хондроитин, амитриптилин-HCl, сульфадиазин, оксикодон-HCl/ацетаминофен, олопатадин-HCl, мизопростол, напроксен натрий, омепразол, циклофосфамид, ритуксимаб, IL-1, TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, анти-IL-18 антитело, анти-IL15 антитело, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740,
- 40 рофлумеласт, IC-485, CDC-801 и мезопрам. Предпочтительные комбинации включают метотрексат или лефлуномид, а в случае умеренного или тяжелого ревматоидного артрита, циклоспорин.

Неограничивающими примерами терапевтических средств для лечения рака, с которыми может быть объединен DLL4-связывающий белок согласно изобретению,

- 45 являются нижеследующие средства: будезонид; эпидермальный фактор роста; кортикостероиды; циклоспорин, сульфасалазин; аминосалицилаты; 6-меркаптопурин; азатиоприн; метронидазол; ингибиторы липоксигеназы; месаламин; олсалазин; балсалазид; антиоксиданты; ингибиторы тромбоксана; антагонисты рецептора IL-1;

моноклональные анти-IL-1 $\beta$  антитела; моноклональные анти-IL-6 антитела; факторы роста; ингибиторы эластазы; соединения пиридинил-имида; антитела или антагонисты, направленные против других человеческих цитокинов или факторов роста, например, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF и PDGF. Антитела согласно изобретению или их антигенсвязывающие части могут быть объединены с антителами против молекул клеточной поверхности, таких как CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 или их лигандов. Антитела согласно изобретению или их антигенсвязывающие части могут быть объединены с такими средствами, как метотрексат, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофенолят-мофетил, лефлуномид, НСПВС, например, ибупрофен, кортикостероиды, такие как преднизолон, ингибиторы фосфодиэстеразы, агонисты аденоцина, антитромботические средства, ингибиторы комплемента, адренергические средства, средства, блокирующие передачу сигнала провоспалительными цитокинами, такими как IL-1 (например, IRAK, пути передачи NIK-сигнала провоспалительными цитокинами, такими как TNF $\alpha$ , IKK, p38 или ингибиторы киназы MAP), ингибиторы IL-1 $\beta$ -конвертирующего фермента, ингибиторы TNF $\alpha$ -конвертирующего фермента, ингибиторы передачи Т-клеточного сигнала, такие как ингибиторы киназы, ингибиторы металлопротеиназы, сульфасалазин, азатиоприн, 6-меркаптопурины, ингибиторы ангиотензин-конвертирующего фермента, растворимые рецепторы цитокинов и их производные (например, растворимые рецепторы TNF p55 или p75, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) и противовоспалительные цитокины (например, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 и TGF $\beta$ ).

Другими примерами терапевтических средств, с которыми может быть объединен DLL4-связывающий белок, являются следующие средства: антагонисты TNF, например, анти-TNF антитела, D2E7 (публикация заявки PCT № WO 97/29131; HUMIRA®), CA2 (REMICADE®), CDP 571, конструкции TNFR-Ig, (p75TNFR-IgG (ENBREL®) и p55TNFR-IgG (LENERCEPT)) и ингибиторы PDE4. Связывающие белки согласно изобретению могут быть объединены с кортикостероидами, например, с будезонидом и дексаметазоном. Связывающие белки согласно изобретению могут быть также объединены с такими средствами, как сульфасалазин, 5-аминосалициловая кислота и олсалазин, и со средствами, блокирующими синтез или действие провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, например, ингибиторы IL-1 $\beta$ -конвертирующего фермента и IL-1ra. DLL4-связывающие белки согласно изобретению могут быть также использованы вместе с ингибиторами передачи Т-клеточных сигналов, например, с ингибиторами тирозинкиназы, 6-меркаптопуринами. DLL4-связывающие белки согласно изобретению могут быть объединены с IL-11. Связывающие белки согласно изобретению могут быть объединены с мезаланином, преднизоном, азатиоприном, меркаптопурином, инфликсимабом, натрий-сукцинатом метилпреднизолона, дифеноксилатом/сульфатом атропина, гидрохлоридом лоперамида, метотрексатом, омепразолом, фолатом, ципрофлоксацином/декстрозой-водой, битартратом гидрокодона/АРАР, гидрохлоридом тетрациклина, флуоцинонидом, метронидазолом, тимерозалом/борной кислотой, холестирамином/сахарозой, гидрохлоридом ципрофлоксацина, сульфатом гиосциамина, гидрохлоридом меперицина, гидрохлоридом мидазолама, оксиодоном-HCl/ацетаминофеном, гидрохлоридом прометазина, фосфатом натрия, сульфаметоксазолом/триметопримом, целекоксибом, поликарбофилом, напсилатом пропоксифена, гидрокортизоном, поливитаминами, балсалазид-динафтирем, фосфатом кодеина/АРАР, колесевеламом-HCl, цианокобаламином, фолиевой кислотой, левофлоксацином, метилпреднизолоном, натализумабом и интерфероном-гамма.

Неограничивающими примерами терапевтических средств, с которыми может быть

объединен связывающий белок согласно изобретению, являются: аспирин, нитроглицерин, мононитрат изосорбида, сукцинат метопролола, атенолол, тартрат метопролола, бензилат амлодипина, гидрохлорид дилтиазема, динитрат изосорбида, бисульфат клопидогrella, нифедипин, аторвастатин кальций, хлорид калия, фуросемид, симвастатин, верапамил-НСl, дигоксин, гидрохлорид пропранолола, карведилол, лизиноприл, спиронолактон, гидрохлортиазид, малеат эналаприла, надолол, рамиприл, эноксапарин натрий, натрийсодержащий гепарин, валсартан, гидрохлорид сotalола, фенофибрат, эzetимиб, бутеманид, лозартан калий, лизиноприл/гидрохлортиазид, фелодипин, каптоприл и фумарат близопролола.

- 10 Фармацевтические композиции согласно изобретению могут включать «терапевтически эффективное количество» или «профилактически эффективное количество» связывающего белка согласно изобретению. Термин «терапевтически эффективное количество» означает количество, которое, в соответствующих дозах и в течение необходимого периода времени, является эффективным для достижения 15 желаемого терапевтического эффекта. Терапевтически эффективное количество связывающего белка может быть определено самим специалистом, и такое количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как тип патологического расстройства, возраст, пол и масса индивидуума, а также от способности связывающего белка вырабатывать желаемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное 20 количество также означает количество, при котором терапевтически благоприятные эффекты превышают любые токсические или негативные эффекты указанного связывающего белка. Термин «профилактически эффективное количество» означает количество, которое, в соответствующих дозах и в течение необходимого периода времени, является эффективным для достижения желаемого профилактического эффекта. 25 Обычно, поскольку профилактическая доза вводится индивидуумам до начала развития заболевания или на ранней стадии его развития, профилактически эффективное количество должно быть меньше терапевтически эффективного количества.

Схемы введения доз могут быть скорректированы для получения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа). Так, 30 например, в течение определенного периода времени может быть введена одна ударная доза, или может быть введено несколько дробных доз, либо эта доза может быть пропорционально снижена или увеличена в зависимости от терапевтической ситуации. Для облегчения введения и для достижения однородности дозы, особенно 35 предпочтительно, если композиции для парентерального введения будут получены в унифицированной лекарственной форме. Используемый здесь термин «унифицированная лекарственная форма» означает физически дискретные единицы, используемые в качестве унитарных доз для лечения млекопитающих; причем каждую дозу такой единицы, содержащей предварительно определенное количество активного соединения, вычисляют так, чтобы достигался желаемый терапевтический эффект в комбинации с требуемым 40 фармацевтическим носителем. Определение спецификации дозы такой унифицированной лекарственной формы согласно изобретению непосредственно зависит от (а) уникальных свойств активного соединения и от конкретно достигаемого терапевтического или профилактического эффекта, и (б) ограничений, известных специалистам и связанных с приготовлением такого активного соединения, с точки зрения восприимчивости 45 индивидуума к такому лечению.

Репрезентативное и неограничивающее терапевтически или профилактически эффективное количество DLL4-связывающего белка согласно изобретению составляет в пределах 0,1-20 мг/кг, а более предпочтительно, 1-10 мг/кг. При этом следует отметить,

что уровни доз могут варьироваться в зависимости от типа и тяжести состояния, подвергаемого лечению. Кроме того, очевидно, что для любого конкретного индивидуума конкретная схема введения доз должна быть скорректирована в зависимости от времени, требующегося для лечения индивидуума, и от назначения врача, осуществляющего введение или наблюдение за введением таких композиций, причем приведенные здесь интервалы доз являются лишь иллюстративными и не ограничивают объем или практическое применение заявленной композиции.

Для специалиста в данной области совершенно очевидно, что в описанные здесь способы могут быть внесены и другие подходящие модификации и изменения, которые могут быть осуществлены с использованием подходящих эквивалентов, не выходящих за рамки объема настоящего изобретения или его вариантов, описанных в настоящей заявке. Хотя настоящее изобретение достаточно подробно описано в настоящей заявке, однако, для лучшего его понимания, в настоящем описании приводятся ссылки на нижеследующие примеры, которые представлены лишь в целях иллюстрации и не ограничивают объема изобретения.

### Примеры

**Пример 1: *In vitro* анализы для определения функциональной активности анти-DLL4 антител.**

**Пример 1.1: Определение аффинности с применением технологии поверхностного плазмонного резонанса BIACORE®.**

Анализ с применением технологии поверхностного плазмонного резонанса BIACORE® (Biacore, Inc, Piscataway, New Jersey, US) позволяет определить аффинность антител или DVD-Ig путем кинетических измерений констант скорости ассоциации и диссоциации. Связывание анти-DLL4 антител с очищенным рекомбинантным внеклеточным доменом DLL4 определяли методом поверхностного плазмонного резонанса на оборудовании Biacore® (Biacore 2000, Biacore 3000 или Biacore T100; GE Healthcare, Piscataway, New Jersey, US) с использованием рабочего буфера HBS-EPB (10 mM HEPES [pH 7,4], 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,1 мг/мл BSA и 0,005% поверхностно-активного вещества P20) при 25°C. Так, например, приблизительно 9000 резонансных единиц козьего поликлонального антитела против человеческого Fc (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Illinois, US), разведенного в 10 mM ацетата натрия (pH 4,5), непосредственно иммунизировали на биосенсорном чипе CM5 экспериментального качества с помощью стандартного набора для связывания с амином в соответствии с инструкциями производителей, и эти процедуры осуществляли при 25 мкг/мл.

Непрореагировавшие молекулы на поверхности биосенсора блокировали этаноламином. Для кинетических анализов уравнения скорости ассоциации и диссоциации, выведенные исходя из лангмюровской модели связывания 1:1, аппроксимировали одновременно для множества инъекций антитела (путем проведения общего эмпирического анализа) с использованием компьютерной программы Scrubber 2 (BioLogic Software), Biacore Biaevaluation 4.0.1 software или оценочной компьютерной программы Biacore T100. Очищенные антитела разводили в рабочем буфере для захвата козьего антитела против человеческого Fc, специфичного к реакционной поверхности. Антитела, которые были захвачены в качестве лиганда (1 мкг/мл), инъецировали на реакционные матрицы, при скорости потока 10 мкл/мин. В процессе анализа, в качестве контроля, все измерения были проведены для «пустой» поверхности для захвата (то есть, в отсутствие иммунизированного анти-DLL4 антитела). Константы скорости ассоциации и диссоциации,  $K_{on}$  ( $M^{-1}c^{-1}$ ) и  $K_{off}$  ( $c^{-1}$ ) определяли при постоянной скорости потока 80 мкл/мин. Константы скорости ассоциации и диссоциации вычисляли путем измерения

кинетики связывания при различных концентрациях антигена в пределах 1,23-900 нМ, полученных в результате серийного 3-кратного разведения, и были включены инъекции только буфера (используемого в качестве двойного контроля). Затем константу равновесной диссоциации  $K_D$  (М) в реакции между антителами и антигеном-мишенью вычисляли исходя из констант скорости кинетической реакции по следующей формуле:  $K_D = K_{off}/K_{on}$ . Затем регистрировали связывание в зависимости от времени и вычисляли константы скорости кинетической реакции. В этом анализе могут быть измерены скорости ассоциации с верхним пределом  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$  и скорости диссоциации с нижним пределом  $10^{-6} \text{ c}^{-1}$ .

**Пример 1.2: Связывание анти-DLL4 антител с растворимым внеклеточным доменом DLL4, которое было определено с помощью ELISA**

**Метод 1 (ELISA с захватом)**

96-луночные планшеты Nunc-Immuno (#439454) покрывали 5 мкг/мл антитела против человеческого IgG (специфичного к Fc $\gamma$ -фрагменту, Jackson ImmunoResearch, #109-005-098, 100 мкл/лунку) в D-PBS (Gibco #14190) и инкубировали в течение ночи при 4°C. ELISA-планшеты 3 раза промывали промывочным буфером (PBS, 0,05% Твин-20), а затем блокировали 200 мл/лунку блокирующим буфером (D-PBS, 1% BSA, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,05% Твин-20) в течение 1 часа при 25°C. Планшеты 3 раза промывали и инкубировали со 100 мкл/лунку анти-DLL4 антител (0,0001-100 нМ, 10-кратное серийное разведение в блокирующем буфере) в течение 1 часа при 25°C, а затем снова 3 раза промывали. Планшеты, содержащие захваченное анти-DLL4 антитело, инкубировали с внеклеточным доменом человеческого DLL4, меченным биотином (10 нМ в блокирующем буфере, 100 мкл/лунку) в течение 1 часа при 25°C, 3 раза промывали и инкубировали со стрептавидином, коньюгированным с ПХ (KPL #474-3000, разведение 1:10000 в блокирующем буфере, 100 мкл/лунку) в течение 1 часа при 25°C. После последней промывки планшеты инкубировали со 100 мкл/лунку субстрата для ELISA (1-Step Ultra TMB-ELISA, Pierce #340280). Реакцию прекращали через 2 минуты при 25°C добавлением 100 мкл/лунку 2н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и считывали оптическую плотность на 450 нм. Данные анализировали с помощью компьютерной программы Graphpad Prism и регистрировали величины EC<sub>50</sub>.

**Метод 2 (планшет, покрытый медью)**

Перед использованием 96-луночные планшеты, покрытые медью (Thermo Scientific #15143), 3 раза промывали промывочным буфером (PBS, 0,05% Твин-20), а затем инкубировали со 100 мл/лунку человеческого DLL4-his или мышиного DLL4-his или DLL4-his яванского макака при 1 мкг/мл в PBS, в течение 1 часа при 25°C со встряхиванием. Затем планшеты 3 раза промывали. После этого в планшет добавляли 100 мкл/лунку рекомбинантных крысиных/человеческих химерных или рекомбинантных человеческих анти-DLL4 антител (0,00164-27 нМ, 4-кратное серийное разведение в ELISA-буфере = PBST, 10% Superblock (Pierce #37515)) в течение 1 часа при 25°C со встряхиванием, а затем снова 3 раза промывали. Планшеты инкубировали с ПХ-коньюгированным козьим анチчеловеческим антителом (Pierce #31412) (разведение 1:40000 в ELISA-буфере, 100 мкл/лунку) в течение 1 часа при 25°C со встряхиванием, а затем 3 раза промывали. После последней промывки, планшеты инкубировали с 100 мкл/лунку субстрата для ELISA (Sigma #T8665). Реакцию прекращали через 8 минут при 25°C добавлением 100 мкл/лунку 1н HCl, и считывали оптическую плотность на 450 нм. Данные анализировали с помощью компьютерной программы Graphpad Prism

и регистрировали величины EC<sub>50</sub>.

**Пример 1.3: Связывание моноклональных анти-DLL4 антител с поверхностью человеческих опухолевых клеточных линий, оцениваемое с помощью проточной цитометрии (FACS)**

5 Стабильные клеточные линии, сверхэкспрессирующие DLL4 клеточной поверхности, собирали из колб с клеточной культурой, четыре раза промывали и ресуспенсировали в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS), содержащем 1% альбумина бычьей сыворотки и 1 mM CaCl<sub>2</sub> (FACS-буфер). 1,5×10<sup>5</sup> клеток инкубировали с  
 10 антителами в различных концентрациях в FACS-буфере в течение 60 минут на льду. Клетки два раза промывали, а затем добавляли 50 мкл конъюгированного с R-фагоэритрином F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента антитела против крысиных IgG (разведение 1:200 в FACS-буфере) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, US, Cat.#1 12-116-072). После инкубирования на льду (4°C, 60 минут) клетки три раза промывали и  
 15 ресуспенсировали в FACS-буфере. Флуоресценцию измеряли на проточном цитометре Becton Dickinson FACSCalibur-HTS (Becton Dickinson, San Jose, California, US). Данные анализировали с использованием компьютерной программы Graphpad Prism, и величины EC<sub>50</sub> регистрировали как концентрацию антитела, при которой уровень связывания достигает 50% от максимального уровня связывания анти-DLL4 антител с DLL4-  
 20 экспрессирующими клетками.

**Пример 1.4: Ингибиование взаимодействия Notch-1 с растворимым внеклеточным доменом DLL4 под действием анти-DLL4 антител (ELISA на конкурентное связывание)**

96-луночные планшеты Nunc-Immuno (#439454 для ELISA huDLL4) и 96-луночные планшеты Costar (#9018 для ELISA muDLL4) покрывали 16 нМ человеческого Notch-1  
 25 (R&D Systems #3647-TK, 100 мкл/лунку в D-PBS) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем планшеты 3 раза промывали промывочным буфером (PBS, 0,05% Твин-20), а затем блокировали 200 мкл/лунку блокирующего буфера (D-PBS, 1% BSA, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,05% Твин-20) в течение 1 часа при 25°C. При блокировании меченный биотином  
 30 человеческий внеклеточный домен DLL4 (14 нМ) смешивали с антителом (30 пМ-66 нМ, 3-кратное серийное разведение в блокирующем буфере) в течение 1 часа при 25°C со встряхиванием. После блокирования аналитические планшеты промывали и инкубировали со смесями DLL4/антител (100 мкл/лунку, 1 час при 25°C со встряхиванием). Затем планшеты снова промывали и добавляли 100 мкл/лунку стрептавидина, конъюгированного с ПХ (Fitzgerald #65R-S104PHRPx, разведенного 1:  
 35 5000 в блокирующем буфере), и оставляли на 1 час при 25°C со встряхиванием. После последней промывки планшеты проявляли с использованием 100 мкл/лунку субстрата (TMB Sigma #T8665), реакцию прекращали после 8-минутного инкубирования при 25°C (для ELISA muDLL4), а затем инкубировали 20 минут при 25°C (для ELISA huDLL4) с использованием 100 мкл/лунку 1н HCl, и оптическую плотность считывали на 450 нм.  
 40 Данные анализировали с помощью компьютерной программы Graphpad Prism, и величины IC<sub>50</sub> регистрировали как концентрацию антитела, при которой достигается 50%-ое снижение уровня связывания DLL4 с Notch 1.

**Пример 1.5: Блокирование связывания растворимого Notch с DLL4-сверхэкспрессирующими клетками 293G под действием моноклональных анти-DLL4 антител, оцениваемое с помощью проточной цитометрии (FACS на конкурентное связывание)**

Анализ на блокирование Notch. Вкратце, стабильные клеточные линии, сверхэкспрессирующие DLL4 клеточной поверхности, собирали из колб для

культивирования ткани и ресуспендировали в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS), содержащем 1% альбумин бычьей сыворотки и 1 мМ CaCl<sub>2</sub> (FACS-буфер). HEK293-hDLL4- или HEK293-mDLL4-клетки распределяли по 96-луночному планшету (с V-образным дном) при плотности  $1,5 \times 10^5$  клеток/лунку в FACS-буфере.

После центрифугирования клеток и отбрасывания супернатанта, в каждую лунку добавляли 50 мкл очищенного IgG с соответствующим разведением и инкубировали на льду при 4°C в течение 60 минут, а затем добавляли 50 мкл/лунку Notch1-биотина при 0,2 мкг/мл для hDLL4-293G или 2,0 мкг/мл для mDLL4-293G (1,0 или 0,1 мкг/мл конечного раствора) и дополнительно инкубировали еще 1 час на льду при 4°C. После двукратной промывки клеток FACS-буфером добавляли 50 мкл стрептавидина, конъюгированного с R-фикаэритрином (разведение 1:150 в FACS-буфере) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, US, catalog no. 016-110-084). После инкубирования на льду (4°C, 60 минут) клетки три раза промывали и ресуспендировали в FACS-буфере. Флуоресценцию измеряли на проточном цитометре Becton Dickinson FACSCalibur-HTS (Becton Dickinson, San Jose, California, US). Данные анализировали с использованием компьютерной программы Graphpad Prism, и величины EC<sub>50</sub> регистрировали как концентрацию, при которой достигается 50%-ое снижение уровня связывания Notch1 с DLL4-экспрессирующими клетками.

**Пример 1.6: Ингибиование DLL4-зависимого увеличения уровня sVEGFR1 (sFLT1) в клетках EA.hy926 под действием анти-DLL4 антител**

96-луночные планшеты с тканевой культурой покрывали 100 мкл/лунку человеческого внеклеточного домена DLL4 при 1,67 мг/мл в D-PBS (Gibco #14190) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем планшеты один раз промывали D-PBS, и клетки EA.hy926 высевали при плотности 4000 клеток/лунку в отсутствие или в присутствии антител. Пролиферацию клеток измеряли через четыре дня с использованием набора для анализа на пролиферацию клеток CyQUANT (Invitrogen, #C35007). Экспрессию sVEGFR1 в кондиционированной среде детектировали с помощью набора для ELISA в соответствии с инструкциями производителей (R&D Systems #DVR100B). Уровни sVEGFR1 нормализовали по RFU, определенным с помощью анализа CyQUANT, с учетом различий в пролиферации клеток.

**Пример 1.7: Ингибиование DLL4-зависимой активации Notch в клетках EA.hy926 под действием анти-DLL4 антител с помощью анализа на Notch-репортер**

В 96-луночные черные планшеты с прозрачным дном для культивирования тканей высевали 7000 сконструированных клеток EA.hy926/лунку, экспрессирующих люциферазу, индуцируемую Notch-чувствительным промотором. Антитела серийно разводили исходя из концентрации 200 нМ и смешивали в течение 15 минут с равным объемом 5000 клеток HEK293G/лунку, экспрессирующих полноразмерный DLL4. Клетки 293G/DLL4 культивировали вместе с Notch-репортер-содержащими клетками EA.hy926 в течение 24 часов в присутствии тестируемых антител. Люциферазную активность анализировали с использованием субстрата Promega (Promega # E2940).

**Пример 1.8: Методы анализа и методика определения идентичности молекул и их физико-химических свойств**

**Метод ПЭГ-преципитации**

Использование ПЭГ для индуцирования фазового фракционирования твердого белка в соответствии с принципом вытеснения объема представляет собой подходящий способ оценки растворимости белка. Использование ПЭГ, по сравнению с другими осаждающими веществами, имеет несколько преимуществ, включая минимальную

денатурацию белков при температурах окружающей среды (что не влияет на третичную структуру белка) и отсутствие необходимости в регуляции температуры в пределах от 4°C до 30°C, то есть исследования по преципитации могут быть проведены при температуре окружающей среды в лабораторных условиях.

- 5      Обычно преципитацию белков с помощью ПЭГ можно объяснить эффектом вытеснения объема. В соответствии с этой теорией, белки стерически вытесняются из областей растворителя, которые заняты линейными цепями ПЭГ. В результате белки концентрируются и, в конечном счете, осаждаются, если они имеют избыточную растворимость. С точки зрения термодинамики, стерическое вытеснение приводит к 10 увеличению химического потенциала белка до тех пор, пока он не превысит химический потенциал белка, находящегося в абсолютно твердом состоянии, что будет приводить к преципитации белка. Это происходит, главным образом, из-за нежелательной высокой свободной энергии взаимодействия между ПЭГ и белками, и приводит к снижению 15 желательной гидратации белка, что обусловлено эффектами стерического вытеснения.
- 15     В водных растворах такая предпочтительная гидратация способствует сохранению нативной структуры белков. Было показано, что вытеснение объема становится более эффективным при увеличении молекулярной массы ПЭГ, то есть с возрастанием молекулярной массы ПЭГ требуется меньшее количество ПЭГ для преципитации белков.

Молекулярная масса ПЭГ 3000 была выбрана для оценки растворимости антител, 20 которые входят в объем настоящего изобретения. 50%-ый раствор ПЭГ получали путем растворения ПЭГ в деионизированной воде в отношении один грамм ПЭГ на 1 мл воды. Затем раствор ПЭГ добавляли к раствору антитела, исходная концентрация которого составляла 0,5 мг/мл или менее, а объем составлял 0,5 мл. После этого постоянно добавляли раствор ПЭГ и смешивали до первого появления устойчивой 25 мутности. Процент ПЭГ 3000, необходимый для достижения такой преципитации, вычисляли как  $50 \times (\text{объем добавленного раствора ПЭГ 3000}/\text{исходный объем раствора антитела перед добавлением ПЭГ})$ .

Процент ПЭГ 3000, необходимый для достижения такой преципитации белка, сравнивали с процентом, необходимым для преципитации белка с известной 30 водорастворимостью. Так, например, водорастворимость адалимумаба превышает 200 мг/мл. Следовательно, если процент, необходимый для преципитации представляющего интерес белка, аналогичен проценту, необходимому для преципитации адалимумаба, то предполагаемая растворимость этого белка аналогична растворимости адалимумаба.

### 35     Метод определения истинной растворимости

Истинную растворимость определяли с использованием центрифужных фильтров Amicon для концентрирования белка в растворе до тех пор, пока не наблюдалось осаждение белка из раствора, или до тех пор, пока не был достигнут минимальный объем, при котором белок может концентрироваться в фильтрующем устройстве. В 40 последнем случае 15-миллилитровые центрифужные фильтры Amicon имеют минимальный объем приблизительно 50 мкл, а 4-миллилитровые центрифужные фильтры Amicon имеют минимальный объем приблизительно 15 мкл.

Сначала белок диализовали с получением соответствующего(их) состава(ов). В этих 45 исследованиях количество антитела составляло 10 мг или гораздо меньше. Затем раствор белка помещали в камеру центрифужного фильтра Amicon для ретентата. Эту камеру подсоединяли к нитроцеллюлозной мемbrane с порами, которые позволяют молекулам, имеющим менее чем 10-30 килодальтон, проходить под действием центробежной силы. Антитела, размер которых обычно составляет 140 килодальтон, удерживались, а вода,

буферные молекулы, небольшие наполнители и соли проходили через поры. Затем фильтр центрифуги вращали в соответствии с инструкциями производителя до тех пор, пока не наблюдалось осаждение белка из раствора, или до тех пор, пока не был достигнут минимальный объем, при котором белок может концентрироваться в

<sup>5</sup> фильтрующем устройстве.

После центрифугирования раствор белка удаляли из камер для ретентата и измеряли концентрацию по поглощению ультрафиолета. Затем раствор оставляли на 1-2 дня при 25°C и 5°C и проводили мониторинг на признаки осаждения.

#### **Методы спектроскопии кругового дихроизма (КД) в ближнем УФ-диапазоне**

- <sup>10</sup> КД-спектроскопия в области ближнего УФ дает важную информацию о третичной структуре белков и является одним из самых широко применяемых методов в этих целях. КД означает дифференциальное поглощение составляющих плоско-поляризованного излучения с левой и правой круговой поляризацией. Для белков хромофорами, имеющими спектр КД в области ближнего УФ (250-320 нм), являются
- <sup>15</sup> ароматические аминокислоты, то есть триптофан, тирозин и фенилаланин и дисульфидные связи, а КД-эффект наблюдается в том случае, если хромофоры имеют асимметрическую (скрытую) конформацию. Сигналы в области от 250 до 270 нм соответствуют фенилаланиновым остаткам, сигналы в области от 270 до 290 нм соответствуют тирозину, сигналы в области от 280 до 300 нм соответствуют триптофану.
- <sup>20</sup> Дисульфидные связи дают широкие слабые сигналы по всему спектру ближнего УФ. КД-спектр в ближнем УФ может быть чувствительным к небольшим изменениям третичной структуры, например, к изменениям, вызываемым взаимодействиями белок-белок, и/или изменениям условий получения состава.

Существует также ряд других факторов, которые могут влиять на КД-спектры ароматических аминокислот. Такими факторами, среди прочих, являются: (1) жесткость молекулы белка, (2) природа водородных связей и (3) взаимодействия между различными ароматическими аминокислотами. Кроме того, белки с большим количеством аминокислот могут иметь более мелкие КД-полосы, что обусловлено гашением положительных и отрицательных полос.

<sup>30</sup> Вкратце, белок диализовали с получением нужного(ных) состава(ов) при 1 мг/мл и сканировали на длине волны 250-320 нм или 240-320 нм на КД-спектрометре Jasco 800. Также сканировали соответствующий состав без белка, и зарегистрированные данные вычитали из данных, полученных в результате сканирования раствора белка. КД-спектр в ближнем УФ представляет собой график зависимости молярной эллиптичности от длины волны в области от 250 или 240 до 320 нм.

<sup>35</sup> В целом, для антител КД-спектр в ближнем УФ с полусигмоидным профилем указывает на хорошую укладку третичной структуры, а более плоский и менее четко выраженный профиль указывает на значительную тенденцию к разворачиванию белка. Компактная укладка ассоциируется с хорошей стабильностью, тогда как плохая укладка указывает на внутреннюю часть, которая может вызывать гидрофобные взаимодействия между молекулами белка и приводить к образованию нежелательных агрегатов.

#### **ДСК-технология**

Термостабильность антител оценивали на ДСК-оборудовании. Используемое ДСК-оборудование представляет собой автоматизированное VP-ДСК-оборудование, снаженное капиллярными ячейками (Microcal, GE Healthcare Ltd./Microcal, Buckinghamshire, UK). Исследования по разворачиванию молекул оценивали путем сканирования при скорости 1°C/минуту при температуре 25°C-95°C для 1 мг/мл образца. Дополнительными параметрами измерений являются период аппроксимации 16 секунд

и время ожидания перед сканированием, составляющее 10 минут, где указанные измерения проводили в режиме отсутствия обратной связи. Для каждого конкретного измерения 420 мкл образца/контроля помещали в держатель для образцов измерительного ДСК-устройства в соответствии со схемой заполнения планшетов, описанной ниже. Полученные термограммы были построены для двух нестационарных моделей в целях получения средних температур и энталпии различных переходов.

Дополнительным требованием, предъявляемым к кандидату на успешное его использование в биологических исследованиях, является сохранение нативного состояния и конформации белка. Белок в водном растворе находится в равновесии между его нативной (уложенной) конформацией и денатурированной (развернутой) конформацией. Стабильность белка в нативном состоянии определяется величиной свободной энергии Гиббса (DG) данной системы и термодинамической взаимосвязью между изменениями энталпии (DH) и энтропии (DS). Положительная DG указывает на то, что нативное состояние является более стабильным, чем денатурированное состояние, то есть, чем выше положительная DG, тем выше стабильность. Для разворачивания белка стабилизирующие силы должны быть устранены. Конформационная энтропия преодолевает стабилизирующие силы, что приводит к разворачиванию белка при температурах, при которых энтропия становится доминантной. ДСК позволяет измерять DH разворачивания белка вследствие тепловой денатурации. Согласно общему закону термодинамики можно утверждать, что чем выше средняя температура перехода (T<sub>m</sub>), тем более стабильным является белок при более низких температурах. При проведении той самой экспериментальной ДСК можно также измерять изменение теплоемкости (DCp) для денатурации белка. Изменения теплоемкости, ассоциированные с разворачиванием белка, обусловлены, главным образом, изменениями характера гидратации боковых цепей, которые скрыты в нативном состоянии, но становятся более доступными для растворителя в денатурированном состоянии. Было показано, что ДСК является ценным прогностическим фактором стабильности белков и других биологических макромолекул в жидких составах (Remmele and Gombotz, *BioPharm.*, 13: 36-46 (2000), и Remmele et al., *Pharm. Res.*, 15: 200-208 (1998)).

### ЭХ-технология

Эксклюзионная хроматография применяется для разделения белков по размеру. Белки, содержащиеся в водной подвижной фазе, пропускают через пористую смолу, упакованную в качестве стационарной фазы на колонке. Время удерживания в колонке зависит от гидродинамического размера белка и размера пор слоя упакованной смолы.

Более мелкие молекулы могут проникать в меньшие поры в смоле и удерживаются дольше, чем более крупные молекулы. После элюирования с колонки белки детектировали по УФ-поглощению. В ЭХ-методе использовали защитный гель TSK (TOSOH Biosciences, Montgomeryville, Pennsylvania, US, cat. no. 08543) и гель TSK G3000SWxL (TOSOH Biosciences, Montgomeryville, Pennsylvania, US, cat. no. 08541). В качестве подвижной фазы использовали 100 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 6,8.

Скорость потока составляла 0,25 мл/минуту. Объем впрыска составлял 20 мкл от 1 мг/мл образца. Колонка имела комнатную температуру. Температура автоматического устройства для взятия образцов составляла 2-8°C. Общее время проведения процедуры составляло 55 минут. Детектирование проводили по УФ-поглощению на длине волны 214 нм, где ширина полосы составляла 8 нм, причем в качестве стандарта использовали поглощение на длине волны 360 нм с шириной полосы 100 нм.

### Метод замораживания-оттаивания

Растворы антител в нужном составе в концентрации 1 мг/мл замораживали при -80°C

в течение по меньшей мере 4 часов, а затем оттаивали при 30°C на водяной бане. Затем раствор снова замораживали при -80°C. Таким образом, проводили 5 циклов замораживания-оттаивания. После проведения определенных циклов замораживания-оттаивания, например, второго и четвертого цикла, часть раствора может быть взята для ЭХ-анализа с последующим повторным замораживанием. Анализ стабильности в условиях замораживания-оттаивания проводили при низких концентрациях белка для получения «худшего сценария», обусловленного более высокой вероятностью денатурации молекул белка на границе раздела «лед-вода». При более высоких концентрациях вероятность соударения белка с поверхностью раздела «лед-вода» прямо пропорционально снижается, а вместо этого, он сталкивается с другими молекулами белка.

#### **Ускоренный метод определения стабильности**

Растворы антител в нужном составе в концентрации 1 мг/мл пропускали через ПВДФ-фильтры с размером пор 0,22 мкм в стерильных условиях и инкубировали при 40°C и/или 50°C в течение по меньшей мере 21 дня. На 7 и 21 дни брали аликвоты в стерильных условиях и подвергали ЭХ-анализу. Затем растворы снова инкубировали.

#### **Пример 2: Продуцирование и выделение человеческих моноклональных анти-DLL4 антител E9 и A10 с применением технологии представления мРНК PROfusion**

С применением технологии представления мРНК PROfusion (см. Chung-Ming Hsieh et al., публикацию заявки на патент США № 2010/0099103), за семь раундов отбирали объединенные библиотеки антител против антигенов DLL4 селезенки и лимфоузлов: 100 нМ меченного биотином внеклеточного домена человеческого DLL4 (раунды 1 и 2), смеси 50 нМ меченного биотином внеклеточного домена человеческого DLL4 и 50 нМ меченного биотином внеклеточного домена мышевого DLL4 (раунд 3), 100 нМ меченного биотином внеклеточного домена человеческого DLL4 (раунды 4 и 5), клеток 293G, стабильно экспрессирующих человеческий DLL4, и 100 нМ меченного биотином внеклеточного домена человеческого DLL4 (раунд 6), и клеток BAF3, стабильно экспрессирующих человеческий и мышевый DLL4 (раунд 7). A10 и E9 идентифицировали после отбора библиотек антител в раунде 7 (таблица 4). При конструировании человеческого IgGl дикого типа эти конструкции обозначали A10.1 и E9.1, соответственно.

Таблица 4  
Данные о последовательностях клонов E9 и A10 полностью человеческих анти-DLL4 антител PROfusion  
(CDR, пронумерованные по Кэбату, подчеркнуты)

35

40

45

Клон	Источник	Изотип	V-область	Зародышевая линия	Последовательность
					12345678901234567890
5 E9	Человеческие лимфоузлы	hulgG1: VL(λ), VH(L234, 235A)	VH	VH4-39	EVQLQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGGSISSSYYWGWR QP <sup>PGK</sup> GLEWIGDIYTGSTY YNPSLKSRTVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARE <u>DVILRGGS</u> DYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:1)
10			VL	V2-1	SYELTQPPSVSPGQTASI TCSGQRLGDKYASWYQQKPG QSPV <sup>LVIYEDSKRPSG</sup> I PER FSGSN <sup>SNGDTATLTISGTQPM</sup> DEADYYC <u>QAWDRDTGVFGY</u> G TRTVL (SEQ ID NO:111)
15 A10	Человеческая селезенка	hulgG1: VL(λ), VH(L234, 235A)	VH	VH3-30	EVLQLESGGGLVKSGGSLRL SCAASGFTFRSHWMSWVRQA PGKGLEWVAIISYDG <sup>SNKYS</sup> ADSVKGRFTISRDNSKN <sup>TLY</sup> LQLNSLRAEDTAVYYCAKAG <u>GGNVGF</u> DIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:112)
20			VL	V2-1	LPVLTQPPSVSPGQTASI TCSAD <sup>KLG</sup> TKYVSWYQQKPG QSPV <sup>LVIYQDAKRPSG</sup> I PER FSGSN <sup>SNGNTATLTISGTQTM</sup> DEADYL <u>CQS</u> WDRSDVVFGGG TKVT <sup>VL</sup> (SEQ ID NO:113)

25 **Пример 3: Характеризация *in vitro* антител E9 и A10 PROfusion**

Аффинность связывания с антигеном DLL4 для антител E9 и A10 определяли с применением BIACORE-технологии, как описано в примере 1.1. Как показано ниже в таблице 5, E9 и A10 имеют аналогичные величины констант равновесной диссоциации по отношению к человеческому DLL4 ( $K_D=3,36$  и  $6,68$  нМ, соответственно) и к DLL4 яванского макака ( $K_D=4,2$  и  $7,8$  нМ, соответственно). E9 также перекрестно реагирует с мышиным и крысиным DLL4 ( $K_D$  16 и 15 нМ, соответственно).

Таблица 5  
Кинетика связывания анти-DLL4 антител PROfusion, оцениваемая методом Biacore

MAb	Кинетика по Biacore											
	huDLL4 ECD			cynoDLL4 ECD			muDLL4 ECD			ratDLL4 ECD		
	Ka	Kd	$K_D$	Ka	Kd	$K_D$	Ka	Kd	$K_D$	Ka	Kd	$K_D$
40 E9	2.0 E+04	6.6 E-05	3.36	1.8 E+04	7.4 E-05	4.2	1.8 E+04	2.6 E-04	16	1.9 E+04	2.9 E-04	15
A10	2.2 E+04	1.5 E-04	6.68	1.9 E+04	1.5 E-04	7.8	--	--	NB	--	--	NB

45 MAb = моноклональное антитело; E = порядок величины (величина, умноженная на 10, то есть, означает экспоненту; Ka ( $M^{-1}c^{-1}$ ); Kd ( $c^{-1}$ );  $K_D$  (нМ); NB = не связывается (900 нМ DLL4)

Активность связывания антитела с антигеном также оценивали с помощью ELISA-

и FACS-анализов (как описано в примере 1.2, 1.3, где величины EC<sub>50</sub> представлены в таблице 3). Антитела E9 и A10, помимо их связывания с рекомбинантным внеклеточным доменом DLL4 (ECD), могут также связываться с DLL4, экспрессируемым на клеточной поверхности (таблица 6).

Способность антител блокировать взаимодействие DLL4 с рецептором Notch1 оценивали с помощью ELISA- и FACS-анализов на конкурентное связывание, описанных в примерах 1.4 и 1.5. Как показано в таблице 6, E9 и A10 эффективно блокируют взаимодействие Notch1 с DLL4 (в форме внеклеточного домена (ECD) и в клеточно-ассоциированной форме). Кроме того, клеточные функциональные анализы были также разработаны для определения способности антител нейтрализовать DLL4-опосредованную клеточную активность *in vitro* (как описано в примерах 1.6 и 1.7). Антитела E9 и A10 ингибировали DLL4-индуцированную активацию Notch и экспрессию sVEGFR1 в клетках EA.hy926 (таблица 6).

Таблица 6  
Активность анти-DLL4 антитела PROfusion *in vitro*

MAb	Анализы на прямое связывание						Анализы на функциональное блокирование						Ингибиование активации Notch в сокультуре huDLL4-клеток (IC <sub>50</sub> , нМ)	
	ELISA с захватом (EC <sub>50</sub> , нМ)			FACS (EC <sub>50</sub> , нМ)			ELISA на конкурентное связывание (IC <sub>50</sub> , нМ)			FACS на конкурентное связывание (IC <sub>50</sub> , нМ)				
	ECD DLL4			DLL4-клетки			ECDDLL4/huNotch-1			huNotch-1/DLL4-клетки				
	hu	Mu	суно	hu	mu	hu	Mu	суно	hu	mu	hu	mu		
F9	0,17	0,18	0,40	7,23	0,32	1,7	2,1	2,1	23,4	3,2	1,0	0,4	6,2	
A10	0,17	-	0,44	0,93	-	2,6	-	5,1	4,4	-	1,5	-	7,3	

MAb = моноклональное антитело; hu = человеческие; mu = мышиные; суно = яванского макака

#### Пример 4: Аффинное созревание антител E9 и A10 PROfusion.

##### Аффинное созревание анти-DLL4 антитела E9

Выравнивание последовательностей показало, что анти-DLL4 антитело E9 имеет наиболее высокую идентичность с VH4-39/JH4 и V2-1/JL6 человеческих зародышевых линий. Для повышения аффинности E9 к DLL4, остатки гипермутированной CDR идентифицировали исходя из других последовательностей человеческих антител, имеющихся в базе данных IgBLAST, которые также обнаруживают высокую идентичность с VH4-39 и V2-1 зародышевой линии. Затем соответствующие остатки CDR E9 подвергали ограниченному мутагенезу посредством ПЦР с использованием праймеров, имеющих низкую вырожденность кодов в этих положениях, в целях создания библиотек антител в формате scFv, подходящем для их применения в процедуре созревания аффинности. Первая библиотека содержала мутации в положениях остатков 30, 31, 32, 33, 50, 54, 56 и 65 в CDR1 и CDR2 VH (нумерация по Кэбату); вторая библиотека содержала мутации в положениях остатков 95-100, 100a, 100b, 100c и 102 в CDR3 VH; а третья библиотека содержала мутации в положениях остатков 27, 30, 31, 33, 52, 53, 93-96 в трех CDR VL. Для дальнейшего повышения идентичности E9 с последовательностями каркасной области человеческой зародышевой линии, остаток Arg в положении VL 103 заменяли остатком Lys, а в третью библиотеку также вносили двойную вырожденность в положениях 80 (A/P) и 100 (S/Y) VL (таблица 7).

Таблица 7

Мутации в аминокислотной последовательности VH и VL E9, введенные для инициации созревания аффинности

## Мутированная последовательность VH E9 (SEQ ID NO: 114)

EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYYTGSTYY

5	NNGN	S	N N N
	G NT	L	A T
	R G		I G
	R		S
			R

10 NPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDVILRGGSDYWQGTLVTVS  

	N	E	YAMAYGGAA D
	D		FSLPFS SL S
	G		QGPRMQ V N
			WV S A R H
			LE K E
			AN Q R
			V L
			G P
			M C
			E I
			M

## Мутированная последовательность VL E9 (SEQ ID NO: 115)

SYELTQPPSVSVPQQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQS PVLVIYEDSKRPSGIPER  

ES	E	V	Q LT
DG			TE
M			AN
K			EQ
L			FS
T			M

25 FSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGYTRVTVL  

A	SEVA	S K
	M AC	
	E S	
	N M	
	K	

30 40 Эти библиотеки E9 переносили в клетки и представляли на клеточной поверхности для отбора на внеклеточный домен биотинилированного DLL4 с низкой концентрацией методом магнитной визуализации, а затем методом клеточного сортирования с активацией флуоресценции (FACS). Затем проводили отбор на более высокие величины констант ассоциации, диссоциации или тех и других, после чего последовательности белков-антител клонов E9 с модулированной аффинностью (таблица 8) регенерировали для обратного превращения в формат IgG для последующей характеризации.

Таблица 8  
Последовательности белков-клонов антител, идентифицированных исходя из библиотек созревания аффинности для анти-DLL4 антитела E9

Аффинно зрелые клонны: области тяжелой цепи (VH)			
5	E9.4	EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSYYWGWIROPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARYDVSLGGSSDH WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:116)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSYYWG (SEQ ID NO:117)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:118)	YDVSLLGGSSDH (SEQ ID NO:119)
10	E9.11	EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSYYWGWIROPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCAREAVPLGGGSDY WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:120)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSYYWG (SEQ ID NO:121)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:122)	EAVPLGGGSDY (SEQ ID NO:123)
15	E9.14	EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISNSRYHWGWIROSPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSKLSSVTAEDTAVYYCAREDVLRLGGSDY WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:124)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	NSRYHWG (SEQ ID NO:125)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:126)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:127)
20	E9.17	EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSYYWGWIROPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCAREEAILGGGSDY WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:128)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSYYWG (SEQ ID NO:129)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:130)	EEAIALGGGSDY (SEQ ID NO:131)
25	E9.18	EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSGYYWGWIROPPGKGLEWIGDINY AGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCAREDVLRLGGSDY WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:132)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSGYYWG (SEQ ID NO:133)	DINYAGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:134)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:135)
30	E9.19	EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSYYWGWIROPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARFDVSLGGGSDT WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:136)	

35

40

45

	CDR1	CDR2	CDR3
	SSYYWG (SEQ ID NO:137)	DIYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:138)	FDVSLGGGSDT (SEQ ID NO:139)
5	E9.22	EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISNSRYHWGWIROQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKGRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQTLTVSS (SEQ ID NO:140)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	NSRYHWG (SEQ ID NO:141)	DIYTGSTYYNPSLKG (SEQ ID NO:142)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:143)
10	E9.48	EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSGYYHWGWIROQPPGKGLEWIGDINY RGSTYYNPSLKSRSVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQTLTVSS (SEQ ID NO:144)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSGYWG (SEQ ID NO:145)	DINYRGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:146)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:147)
15	E9.65	EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSIRNSRYHWGWIROQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKGRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQTLTVSS (SEQ ID NO:148)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	NSRYHWG (SEQ ID NO:149)	DIYTGSTYYNPSLKG (SEQ ID NO:150)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:151)
20	E9.66	EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSYYHWGWIROQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRSVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCAREGVPLGGGADK WGQTLTVSS (SEQ ID NO:152)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSYYWG (SEQ ID NO:153)	DIYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:154)	EGVPLGGGADK (SEQ ID NO:155)
25	E9.71	EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSYYHWGWIROQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRSVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCARQALAMGGSDK WGQTLTVSS (SEQ ID NO:156)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSYYWG (SEQ ID NO:157)	DIYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:158)	QALAMGGSDK (SEQ ID NO:159)
30	E9.13	EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSYYHWGWIROQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRSVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQTLTVSS (SEQ ID NO:160)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSYYWG (SEQ ID NO:161)	DIYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:162)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:163)
35	E9.16	EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSYYHWGWIROQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRSVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQTLTVSS (SEQ ID NO:164)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSYYWG (SEQ ID NO:165)	DIYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:166)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:167)
40	E9.38	EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSYYHWGWIROQPPGKGLEWIGDIYY	

	TGSTYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFSLKLSS VTAADT AVYY CARE D VILRGGSDY WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:168)		
5	CDR1	CDR2	CDR3
	SSYYWG (SEQ ID NO:169)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:170)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:171)
	E9.2B	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSNNYYWGWIROPPGKGLEWIGDINY NGNTYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFSLKLSS VTAADT AVYY CARE A VALGGGADD WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:172)	
10	CDR1	CDR2	CDR3
	SSNYWG (SEQ ID NO:173)	DINYNGNTYYNPSLKS (SEQ ID NO:174)	EAVALGGGADD (SEQ ID NO:175)
	E9.1F	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSGSYYWGWIROPPGKGLEWIGDINY IGSTYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFSLKLSS VTAADT AVYY CARE A VS F GGGADS WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:176)	
15	CDR1	CDR2	CDR3
	SGSYYWG (SEQ ID NO:177)	DINYIGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:178)	EA VS F GGGADS (SEQ ID NO:179)
20	E9.10H	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSGYWGWIROPPGKGLEWIGDIYY <b>TGNTYYNPSLKN</b> RVTISVDT SKNQFSLKLSS VTAADT AVYY CARE <b>EEVILGGGADQ</b> WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:180)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSGYWG (SEQ ID NO:181)	DIYYTGNTYYNPSLKN (SEQ ID NO:182)	<b>EEVILGGGADQ</b> (SEQ ID NO:183)
25	E9.5E	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSYYWGWIROPPGKGLEWIGDINY <b>IGSTYYNPSLKS</b> RVTISVDT SKNQFSLKLSS VTAADT AVYY CARE <b>ESVPLGGGADE</b> WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:184)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSYYWG (SEQ ID NO:185)	DINYIGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:186)	<b>ESVPLGGGADE</b> (SEQ ID NO:187)
30	E9.10C	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSYYWGWIROPPGKGLEWIGDIYY <b>TGSTYYNPSLKS</b> RVTISVDT SKNQFSLKLSS VTAADT AVYY CARE <b>QAVMYGGSDN</b> WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:188)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGSYYWG (SEQ ID NO:189)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:190)	<b>QAVMYGGSDN</b> (SEQ ID NO:191)
35	E9.7E	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSYYWGWIROPPGKGLEWIGDIYY <b>AGSTYYNPSLKD</b> RVTISVDT SKNQFSLKLSS VTAADT AVYY CARE <b>EDMILGGGADN</b> WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:192)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSYYWG (SEQ ID NO:193)	DIYYAGSTYYNPSLKD (SEQ ID NO:194)	<b>EDMILGGGADN</b> (SEQ ID NO:195)
40	E9.12B	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSNYWGWIROPPGKGLEWIGDIYY <b>TGSTYYNPSLKS</b> RVTISVDT SKNQFSLKLSS VTAADT AVYY CARE <b>EA VS F GGGADS</b> WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:196)	
	CDR1	CDR2	CDR3
45		SSNYWG (SEQ ID NO:197)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:198)
			<b>EA VS F GGGADS</b> (SEQ ID NO:199)

5	E9.10E	EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSIN <b>SGNYYWGWIROPPGKGLEWIGD</b> <b>ISY</b> <b>TGSTYYNPSLKS</b> RVTISVDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCAR <b>EDVMYGGGGDS</b> WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:200)	CDR1 CDR2 CDR3
		<b>SGNYYWG</b> (SEQ ID NO:201)	<b>DISYTGSTYYNPSLKS</b> (SEQ ID NO:202)
			<b>EDVMYGGGGDS</b> (SEQ ID NO:203)
10	E9.6A	EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSIS <b>SSSYYWGWIROPPGKGLEWIGD</b> <b>INY</b> <b>AGSTYYNPSLKN</b> RVTISVDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCAR <b>EAVALGGGADS</b> WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:204)	CDR1 CDR2 CDR3
		<b>SSYYWG</b> (SEQ ID NO:205)	<b>DINYAGSTYYNPSLKN</b> (SEQ ID NO:206)
			<b>EAVALGGGADS</b> (SEQ ID NO:207)
15	E9.7A	EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSIS <b>SSSYYWGWIROPPGKGLEWIGD</b> <b>INY</b> <b>AGSTYYNPSLKS</b> RVTISVDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCAR <b>EDVKFGGGADL</b> WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:208)	CDR1 CDR2 CDR3
		<b>SSYYWG</b> (SEQ ID NO:209)	<b>DINYAGSTYYNPSLKS</b> (SEQ ID NO:210)
			<b>EDVKFGGGADL</b> (SEQ ID NO:211)
20	E9.8H	EVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSIS <b>SGSYYWGWIROPPGKGLEWIGD</b> <b>IYY</b> <b>TGSTYYNPSLKN</b> RVTISVDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCAR <b>ESVPLGGGADN</b> WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:212)	CDR1 CDR2 CDR3
		<b>SGSYYWG</b> (SEQ ID NO:213)	<b>DIYYTGSTYYNPSLKN</b> (SEQ ID NO:214)
			<b>ESVPLGGGADN</b> (SEQ ID NO:215)
25			
	<b>Аффинно зрелые клоны: области легкой цепи (VL)</b>		
30	E9.13	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGDTLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSERPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDSETGVFGSGTKVTVL (SEQ ID NO:216)	CDR1 CDR2 CDR3
		SGDTLGDKYVS (SEQ ID NO:217)	EDSERPS (SEQ ID NO:218)
			QAWDSETGV (SEQ ID NO:219)
35	E9.16	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGERLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDFKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:220)	CDR1 CDR2 CDR3
		SGERLGDKYVS (SEQ ID NO:221)	EDFKRPS (SEQ ID NO:222)
			QAWDRDTGV (SEQ ID NO:223)
40	E9.38	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDVGVFGSGTKVTVL (SEQ ID NO:224)	CDR1 CDR2 CDR3
		SGQRLGDKYVS (SEQ ID NO:225)	EDSKRPS (SEQ ID NO:226)
			QAWDRDVGV (SEQ ID NO:227)
45	E9.4	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS	

	GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:228)		
5	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:229)	EDSKRPS (SEQ ID NO:230)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:231)
10	E9.11	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPV р VIYEDSKRPS GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:232)	CDR3
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:233)	EDSKRPS (SEQ ID NO:234)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:235)
15	E9.14	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPV р VIYEDSKRPS GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:236)	CDR3
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:237)	EDSKRPS (SEQ ID NO:238)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:239)
20	E9.17	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPV р VIYEDSKRPS GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:240)	CDR3
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:241)	EDSKRPS (SEQ ID NO:242)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:243)
25	E9.18	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPV р VIYEDSKRPS GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:244)	CDR3
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:245)	EDSKRPS (SEQ ID NO:246)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:247)
30	E9.19	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPV р VIYEDSKRPS GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:248)	CDR3
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:249)	EDSKRPS (SEQ ID NO:250)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:251)
35	E9.22	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPV р VIYEDSKRPS GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:252)	CDR3
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:253)	EDSKRPS (SEQ ID NO:254)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:255)
40	E9.48	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPV р VIYEDSKRPS GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:256)	CDR3
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:257)	EDSKRPS (SEQ ID NO:258)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:259)

5	E9.65	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLIYEDSKRPS KRPSGIPERFSGNSNGDTATLTISGTQPMDEADYYCQA WDRDTGVFGYGT KVTVL (SEQ ID NO: 260)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO: 261)	EDSKRPS (SEQ ID NO: 262)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO: 263)
10	E9.66	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLIYEDSKRPS GIPERFSGNSNGDTATLTISGTQPMDEADYYCQA WDRDTGVFGYGT KVTVL (SEQ ID NO: 264)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO: 265)	EDSKRPS (SEQ ID NO: 266)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO: 267)
15	E9.71	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLIYEDSKRPS GIPERFSGNSNGDTATLTISGTQPMDEADYYCQA WDRDTGVFGYGT KVTVL (SEQ ID NO: 268)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO: 269)	EDSKRPS (SEQ ID NO: 270)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO: 271)
20	E9.2B	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGEGLGDKYVSWYQQKPGQSPVLIYEDSTRPS GIPERFSGNSNGDTATLTISGTQPMDEADYYCQA WDRDTGVFGSGTKVTVL (SEQ ID NO: 272)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGEGLGDKYVS (SEQ ID NO: 273)	EDSTRPS (SEQ ID NO: 274)	QAWDSETGV (SEQ ID NO: 275)
25	E9.1F	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGDRLGDKYVSWYQQKPGQSPVLIYEDSQRPS GIPERFSGNSNGDTATLTISGTQAMDEADYYCQA WDRDTGVFGSGTKVTVL (SEQ ID NO: 276)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGDRLGDKYVS (SEQ ID NO: 277)	EDSQRPS (SEQ ID NO: 278)	QAWDMEAGV (SEQ ID NO: 279)
30	E9.10 C	SYELTQPPSVSPGQTASITCS <b>GDRLGDKYVS</b> WYQQKPGQSPVLIY <b>EDSERPS</b> GIPERFSGNSNGDTATLTISGTQAMDEADYYC <b>QAWDSETGVFGSGTKVT</b> (SEQ ID NO: 280)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	<b>SGDRLGDKYVS</b> (SEQ ID NO: 281)	<b>EDSERPS</b> (SEQ ID NO: 282)	<b>QAWDSETGV</b> (SEQ ID NO: 283)
35	E9.10 E	SYELTQPPSVSPGQTASITCS <b>GEGLGDKYVS</b> WYQQKPGQSPVLIY <b>EDSERPS</b> GIPERFSGNSNGDTATLTISGTQAMDEADYYC <b>QAWDSEAGVFGSGTKVT</b> (SEQ ID NO: 284)	
	CDR1	CDR2	CDR3
	<b>SGEGLGDKYVS</b> (SEQ ID NO: 285)	<b>EDSERPS</b> (SEQ ID NO: 286)	<b>QAWDSEAGV</b> (SEQ ID NO: 287)
40	E9.7E	SYELTQPPSVSPGQTASITCS <b>GDRLGDKYVS</b> WYQQKPGQSPVLIY <b>ED SERPS</b> GIPERFSGNSNGDTATLTISGTQAMDEADYYC <b>QAWDSEAGVFGSG TKVT</b> (SEQ ID NO: 288)	

	CDR1	CDR2	CDR3
	<b>SGDRLGDKYVS</b> (SEQ ID NO:289)	<b>EDSERPS</b> (SEQ ID NO:290)	<b>QAWDSEAGV</b> (SEQ ID NO:291)
5	E9.5E	SYELTQPPSVSVPQGTASITC <b>SGDMLGDKYVS</b> WYQQKPGQSPVLVIY <b>EDSQRPS</b> GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC <b>QAWDSETGV</b> FGSGTKVT (SEQ ID NO:292)	
		CDR1	CDR2
10		<b>SGDMLGDKYVS</b> (SEQ ID NO:293)	<b>EDSQRPS</b> (SEQ ID NO:294)
	E9.12B	SYELTQPPSVSVPQGTASITC <b>SGDGLGDKYVS</b> WYQQKPGQSPVLVIY <b>EDSTRPS</b> GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC <b>QAWDSES</b> <b>GV</b> FGSGTKVT (SEQ ID NO:296)	
15		CDR1	CDR2
		<b>SGDGLGDKYVS</b> (SEQ ID NO:297)	<b>EDSTRPS</b> (SEQ ID NO:298)
20	E9.10H	SYELTQPPSVSVPQGTASITC <b>SGESLGDKYVS</b> WYQQKPGQSPVLVIY <b>EDSKRPS</b> GIPERFSGNSGDTATLTISGTQAMDEADYYC <b>QAWDGET</b> <b>GV</b> FGSGTKVT (SEQ ID NO:300)	
		CDR1	CDR2
25		<b>SGESLGDKYVS</b> (SEQ ID NO:301)	<b>EDSKRPS</b> (SEQ ID NO:302)
	E9.6A	SYELTQPPSVSVPQGTASITC <b>SGDMLGDKYVS</b> WYQQKPGQSPVLVIY <b>EDTNRPS</b> GIPERFSGNSGDTATLTISGTQAMDEADYYC <b>QAWDSET</b> <b>GV</b> FGSGTKVT (SEQ ID NO:304)	
30		CDR1	CDR2
		<b>SGDMLGDKYVS</b> (SEQ ID NO:305)	<b>EDTNRPS</b> (SEQ ID NO:306)
35	E9.7A	SYELTQPPSVSVPQGTASITC <b>SGESLGDKYVS</b> WYQQKPGQSPVLVIY <b>QADM</b> <b>RPS</b> GIPERFSGNSGDTATLTISGTQAMDEADYYC <b>QAWDMET</b> <b>GV</b> FGSGTKVT (SEQ ID NO:308)	
		CDR1	CDR2
40		<b>SGESLGDKYVS</b> (SEQ ID NO:309)	<b>QADM</b> <b>RPS</b> (SEQ ID NO:310)
	E9.8H	SYELTQPPSVSVPQGTASITC <b>SGESLGDKYVS</b> WYQQKPGQSPVLVIY <b>EDSMRPS</b> GIPERFSGNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC <b>QAWDSE</b> <b>VG</b> FGSGTKVT (SEQ ID NO:312)	
45		CDR1	CDR2
		<b>SGESLGDKYVS</b> (SEQ ID NO:313)	<b>EDSMRPS</b> (SEQ ID NO:314)
	<b>QAWDSE</b> <b>VG</b> (SEQ ID NO:315)		

### Аффинное созревание анти-DLL4 антитела A10

Аналогично созреванию аффинности E9, описанному выше, выравнивание последовательностей показало, что анти-DLL4 антитело A10 имеет наиболее высокую идентичность с VH3-30 и V2-1 человеческих зародышевых линий. Человеческие последовательности VH и V $\lambda$ , происходящие от VH3-30 и V2-1, соответственно, брали из базы данных NCBI IgBlast для создания логоса последовательности. Эти логосы использовали для того, чтобы решить, какие именно последовательности должны быть введены для генерирования аффинно зрелых библиотек.

Библиотеки A10 переносили в клетки и представляли на клеточной поверхности для отбора на внеклеточный домен биотинилированного DLL4 с низкой концентрацией

методом магнитной визуализации, а затем методом клеточного сортинга с активацией флуоресценции. Затем проводили отбор на более высокие величины констант ассоциации, диссоциации или тех и других, после чего последовательности белков-антител клонов A10 с модулированной аффинностью регенерировали для обратного превращения в 5 формат IgG для последующей характеристизации. Области тяжелой цепи (VH) аффинно зрелых клонов представлены ниже в таблице 9, а области легкой цепи (VL) аффинно зрелых клонов представлены ниже в таблице 10.

Таблица 9  
Вариабельные области тяжелой цепи (VH)  
аффинно зрелых клонов A10

	Область белка		Последовательность
			<b>123456789012345678901234567890</b>
10	A10.3 VH		EVQLVESGGGLVKSGGSRLSCAASGFTFR <b>SHWMSWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSNKYS</b> <b>ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAED</b> TAVYYCAK <b>AGGGNVGFDI</b> WGQGTMVTVSS (SEQ ID NO: 316)
15	A10.3 VH	CDR-H1	Oстатки 31-35 последовательности SEQ ID NO: 316 <b>SHWMS</b>
20	A10.3 VH	CDR-H2	Oстатки 50-66 последовательности SEQ ID NO: 316 <b>IISYDGSNKYSADSVKG</b>
25	A10.3 VH	CDR-H3	Oстатки 99-108 последовательности SEQ ID NO: 316 <b>AGGGNVGFDI</b>
30	A10.K30 VH		EVQLVESGGVVQPGGSRLSCAASGFTFG <b>NHWMSWVRQAPGKGLEWADISSDGRYKYY</b> <b>ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAED</b> TAVYYCAK <b>AGGGNVGFDI</b> WGQGTMVTVSS (SEQ ID NO: 317)
35	A10.K30 VH	CDR-H1	Oстатки 31-35 последовательности SEQ ID NO: 317 <b>NHWMS</b>
40	A10.K30 VH	CDR-H2	Oстатки 50-66 последовательности SEQ ID NO: 317 <b>DISSDGRYKYYADSVKG</b>
	A10.K30 VH	CDR-H3	Oстатки 99-108 последовательности SEQ ID NO: 317 <b>AGGGNVGFDI</b>
	A10.K42 VH		EVQLVESGGGLVQPGGSRLSCAASGFTFQ <b>SHWMSWVRQAPGKGLEWAMISYDGTIKY</b> <b>ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAED</b> TAVYYCAK <b>AGGGNVGFDI</b> WGQGTMVTVSS (SEQ ID NO: 318)
	A10.K42 VH	CDR-H1	Oстатки 31-35 последовательности SEQ ID NO: 318 <b>SHWMS</b>
	A10.K42 VH	CDR-H2	Oстатки 50-66 последовательности SEQ ID NO: 318 <b>MISYDGTIKYADSVKG</b>

			<b>123456789012345678901234567890</b>
5	A10.K42 VH	CDR-H3	Остатки 99-108 последовательности SEQ ID NO: 318  <b>AGGGNVGFDI</b>
10	A10.9A VH		EVQLVESGGVVQPGGRSLRLSCAASGFTFR <b>SYWMSWVRQAPGKGLEWATISYDGRNKDY</b> <b>ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAED</b> TAVYYCAK <b>AGGGNVGFDI</b> WGQGTMVTVSS (SEQ ID NO: 319)
15	A10.9A VH		Остатки 31-35 последовательности SEQ ID NO: 319  <b>SYWMS</b>
20	A10.9A VH		Остатки 50-66 последовательности SEQ ID NO: 319  <b>TISYDGRNKDYADSVKG</b>
25	A10.9A VH		Остатки 99-108 последовательности SEQ ID NO: 319  <b>AGGGNVGFDI</b>
30	A10.8A VH		EVQLVESGGVVQPGGSRLSCAASGFTFG <b>NHWMSWVRQAPGKGLEWADISSDGRYKYY</b> <b>ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAED</b> TAVYYCAK <b>AGGGNVGFDI</b> WGQGTMVTVSS (SEQ ID NO: 320)
35	A10.8A VH		Остатки 31-35 последовательности SEQ ID NO: 320  <b>NHWMS</b>
40	A10.8A VH		Остатки 50-66 последовательности SEQ ID NO: 320  <b>DISSDGRYKYYADSVKG</b>
	A10.8A VH		Остатки 99-108 последовательности SEQ ID NO: 320  <b>AGGGNVGFDI</b>
	A10.1A VH		EVQLVESGGVVQPGGSRLSCAASGFTFH <b>SHWMSWVRQAPGKGLEWAMISDDGRNKDY</b> <b>ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQLNSLRAED</b> TAVYYCAR <b>AGGNVGLDI</b> WGQGTMVTVSS (SEQ ID NO: 321)
45	A10.1A VH		Остатки 31-35 последовательности SEQ ID NO: 321  <b>SHWMS</b>
	A10.1A VH		Остатки 50-66 последовательности SEQ ID NO: 321  <b>MISDDGRNKDYADSVKG</b>
	A10.1A VH		Остатки 99-108 последовательности SEQ ID NO: 321  <b>AAGGNVGLDI</b>
	A10.5D VH		EVQLVESGGVVQSGGSRLSCAASGFTFG <b>SHWMSWVRQAPGKGLEWADISVDGSNKYS</b> <b>ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED</b> TAVYYCAR <b>AAGGNVGLDS</b> WGQGTMVTVSS (SEQ ID NO: 322)
	A10.5D VH		Остатки 31-35 последовательности SEQ ID NO: 322  <b>SHWMS</b>
	A10.5D VH		Остатки 50-66 последовательности SEQ ID NO: 322  <b>DISVDGSNKYSADSVKG</b>

			<b>123456789012345678901234567890</b>
5	A10.5D VH	Остатки 99-108 последовательности SEQ ID NO: 322	<b>AAGGNVGLDS</b>
10	A10.3A VH		EVQLVESGGVVQPGGSRLSCAASGFTFG <b>NHWMSWVRQAPGKGLEWVADISSDGRYKYY</b> <b>ADSVKGRFTISRDNSKNLTYLQLNSLRAED</b> TAVYYCAK <b>AGGGNVGFDIWGQGTMVTVSS</b> (SEQ ID NO: 323)
15	A10.3A VH	Остатки 31-35 последовательности SEQ ID NO: 323	<b>NHWMS</b>
20	A10.3A VH	Остатки 50-66 последовательности SEQ ID NO: 323	<b>DISSDGRYKYYADSVKG</b>
25	A10.3A VH	Остатки 99-108 последовательности SEQ ID NO: 323	<b>AGGGNVGFDI</b>
30	A10.6B VH		EVQLVESGGVVQPGGSRLSCAASGFTFG <b>NHWMSWVRQAPGKGLEWVADISSDGRYKYY</b> <b>ADSVKGRFTISRDNSKNLTYLQLNSLRAED</b> TAVYYCAK <b>AGGGNVGFDIWGQGTMVTVSS</b> (SEQ ID NO: 324)
35	A10.6B VH	Остатки 31-35 последовательности SEQ ID NO: 324	<b>NHWMS</b>
40	A10.6B VH	Остатки 50-66 последовательности SEQ ID NO: 324	<b>DISSDGRYKYYADSVKG</b>
45	A10.6B VH	Остатки 99-108 последовательности SEQ ID NO: 324	<b>AGGGNVGFDI</b>
			EVQLVESGGVVQPGRSRLSCAASGFTFR <b>SHWMSWVRQAPGKGLEWVADISQDGSYKYY</b> <b>ADSVKGRFTISRDNSKNLTYLQMNSLRAED</b> TAVYYCAR <b>AGGGNVGFDIWGQGTMVTVSS</b> (SEQ ID NO: 325)
	A10.3D VH	Остатки 31-35 последовательности SEQ ID NO: 325	<b>SHWMS</b>
	A10.3D VH	Остатки 50-66 последовательности SEQ ID NO: 325	<b>DISQDGSYKYYADSVKG</b>
	A10.3D VH	Остатки 99-108 последовательности SEQ ID NO: 325	<b>AGGGNVGFDI</b>
	A10.4C VH		EVQLVESGGVVQPGGSRLSCAASGFTFG <b>SHWMSWVRQAPGKGLEWVADISNDGRYAYS</b> <b>ADSVKGRFTISRDNSKNLTYLQLNSLRAED</b> TAVYYCAK <b>AGGGNVGFDIWGQGTMVTVSS</b> (SEQ ID NO: 326)
	A10.4C VH	Остатки 31-35 последовательности SEQ ID NO: 326	<b>SHWMS</b>
	A10.4C VH	Остатки 50-66 последовательности SEQ ID NO: 326	<b>DISNDGRYAYSADSVKG</b>
			<b>123456789012345678901234567890</b>
	A10.4C VH	Остатки 99-108 последовательности SEQ ID NO: 326	<b>AGGGNVGFDI</b>

Таблица 10  
Вариабельные области легкой цепи (VL) аффинно зрелых клонов A10

Область белка			Последовательность
			<b>123456789012345678901234567890</b>
5	A10.3 VL		SYELTQPPSVSVSPGQTASITC <b>SADKLGTKYVS</b> WYQQKPGQSPVLIY <b>QDAKRPSGIPER</b> FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYLC <b>QSW</b> <b>DRSDVVFGGGTKLTVL</b> (SEQ ID NO: 327)
10	A10.3 VL	CDR-L1	Остатки 23-33 последовательности SEQ ID NO: 327 <b>SADKLGTKYVS</b>
	A10.3 VL	CDR-L2	Остатки 49-55 последовательности SEQ ID NO: 327 <b>QDAKRPS</b>
	A10.3 VL	CDR-L3	Остатки 88-96 последовательности SEQ ID NO: 327 <b>QSWDRSDVV</b>
15	A10.L45 VL		SYELTQPPSVSVSPGQTASITC <b>SADELGTQYVS</b> WYQQKPGQSPVLIY <b>QDATRPSGIPER</b> FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC <b>QAW</b> <b>DRSGVVFGGGTKLTVL</b> (SEQ ID NO: 328)
	A10.L45 VL	CDR-L1	Остатки 23-33 последовательности SEQ ID NO: 328 <b>SADELGTQYVS</b>
	A10.L45 VL	CDR-L2	Остатки 49-55 последовательности SEQ ID NO: 328 <b>QDATRPS</b>
20	A10.L45 VL	CDR-L3	Остатки 88-96 последовательности SEQ ID NO: 328 <b>QAWDRSGVV</b>
	A10.L73 VL		SYELTQPPSVSVSPGQTASITC <b>SGDNLGSQYVS</b> WYQQKPGQSPVLIY <b>QDAQRPSGIPER</b> FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC <b>QAW</b> <b>DRSGVVFGGGTKLTVL</b> (SEQ ID NO: 329)
	A10.L73 VL	CDR-L1	Остатки 23-33 последовательности SEQ ID NO: 329 <b>SGDNLGSQYVS</b>
25	A10.L73 VL	CDR-L2	Остатки 49-55 последовательности SEQ ID NO: 329 <b>QDAQRPS</b>
	A10.L73 VL	CDR-L3	Остатки 88-96 последовательности SEQ ID NO: 329 <b>QAWDRSGVV</b>
	A10.3A VL		SYELTQPPSVSVSPGQTASITC <b>SADNLGEK</b> WYQQKPGQSPVLIY <b>QDATRPSGIPER</b> FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC <b>QSW</b> <b>DSSGAVFGGGTKLTVL</b> (SEQ ID NO: 330)
30	A10.3A VL	CDR-L1	Остатки 23-33 последовательности SEQ ID NO: 330 <b>SADNLGEKYVS</b>
35			

40

45

			<b>123456789012345678901234567890</b>
5	A10.3A VL	CDR-L2	Остатки 49-55 последовательности SEQ ID NO: 330 <b>QDATRPS</b>
	A10.3A VL	CDR-L3	Остатки 88-96 последовательности SEQ ID NO: 330 <b>QSWDSSGAV</b>
10	A10.6B VL		SYELTQPPSVSVPQQTASITC <b>SADNLGNQ</b> <b>YVS</b> WYQQKPGQSPVLIY <b>QDGMRPSGIPER</b> FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC <b>QAW</b> <b>DWSGEV</b> FGGGTLTVL (SEQ ID NO: 331)
	A10.6B VL	CDR-L1	Остатки 23-33 последовательности SEQ ID NO: 331 <b>SADNLGNQYVS</b>
15	A10.6B VL	CDR-L2	Остатки 49-55 последовательности SEQ ID NO: 331 <b>QDGMRPS</b>
	A10.6B VL	CDR-L3	Остатки 88-96 последовательности SEQ ID NO: 331 <b>QAWDWSGEV</b>
20	A10.3D VL		SYELTQPPSVSVPQQTASITC <b>SADKLGTK</b> <b>YVS</b> WYQQKPGQSPVLIY <b>QDGMRPSGIPER</b> FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC <b>QSW</b> <b>DQSGAV</b> FGGGTTLTVL (SEQ ID NO: 332)
	A10.3D VL	CDR-L1	Остатки 23-33 последовательности SEQ ID NO: 332 <b>SADKLGTKYVS</b>
25	A10.3D VL	CDR-L2	Остатки 49-55 последовательности SEQ ID NO: 332 <b>QDGMRPS</b>
	A10.3D VL	CDR-L3	Остатки 88-96 последовательности SEQ ID NO: 332 <b>QSWDQSGAV</b>
30	A10.4C VL		SYELTQPPSVSVPQQTASITC <b>SADNLGNQ</b> <b>YVS</b> WYQQKPGQSPVLIY <b>QDGMRPSGIPER</b> FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC <b>QAW</b> <b>DSSGAV</b> FGGGTTLTVL (SEQ ID NO: 333)
	A10.4C VL	CDR-L1	Остатки 23-33 последовательности SEQ ID NO: 333 <b>SADNLGNQYVS</b>
35	A10.4C VL	CDR-L2	Остатки 49-55 последовательности SEQ ID NO: 333 <b>QDGMRPS</b>
	A10.4C VL	CDR-L3	Остатки 88-96 последовательности SEQ ID NO: 333 <b>QAWDSSGAV</b>

### Пример 5: Конструирование CDR-привитых антител E9

- CDR VH E9 присоединяли к консенсусной каркасной области VH3 (привитые VH=E9vh3g2), а CDR VL E9 присоединяли к каркасной области VL2-1 анти-DLL4 антитела A10 (привитые VL=E9a10vlg2) и к каркасной области VK A10 зародышевой линии (наиболее близкой по своей гомологии к VL E9) (привитые VL=E9AVK). Альтернативно, репарацию каркасной области (FW) также проводили с использованием VH E9; и эта FW была сохранена, но аминокислоты, которые могут вызывать нестабильность
- 40 45 антитела, были заменены (репарированная VH=E9VH4r2). Обратные мутации каркасной области вводили в CDR-привитую и в FW-репарированную области для сохранения структуры и функции антитела (таблица 11 и таблица 14).

CDR E9 также присоединяли к каркасным областям анти-IL-18 и анти-IL-12 антител.

В частности, CDR VH E9 присоединяли к каркасной области VH5-51 анти-IL-18 антитела (привитые VH=E9VH325) и к каркасной области VH2-70 анти-IL-12 антитела (привитые VH=E9VH1D4.1). CDR VL E9 присоединяли к каркасной области VK L2/L16 анти-IL-12 (привитые VL=E9VL325) и к каркасной области VK B3 анти-IL-12 антитела (привитые VL=E9VL1D4.1). Обратные мутации каркасной области вводили в CDR-привитую область для сохранения структуры и функции антитела (таблица 15 и таблица 18).

*In silico*-сконструированные CDR-привитые антитела, описанные выше, синтезировали непосредственно в выбранную плазмиду с применением биотехнологического метода Blue Heron. Вариабельную область тяжелой цепи встраивали, с сохранением рамки считывания, в кДНК-фрагмент, кодирующий константную область человеческого IgGl дикого типа, и в кДНК-фрагмент, кодирующий константную область человеческого IgGl, содержащую две аминокислотные мутации в шарнирной области. Эти мутации были получены в результате замены лейцина аланином в положении 234 (в соответствии с Европейской системой нумерации) и замены лейцина аланином 235 (Lund et al., *J. Immunol.*, 147: 2657 (1991)). Вариабельную область легкой цепи встраивали, с сохранением рамки считывания, в человеческую константную область лямбда и в человеческую константную область каппа. После получения синтезированных конструкций методом Blue Heron, ДНК масштабировали и подтверждали ее последовательность. «Правильно» CDR-привитые тяжелые и легкие цепи, соответствующие каждому антителу (таблицы 11 и 14) (таблицы 15 и 18), совместно переносили в клетки HEK-293-6E для кратковременного продуцирования полноразмерных CDR-привитых анти-DLL4 антител. В таблице 11 систематизированы все созданные варианты антител E9 и данные экспрессии HEK-293-6e. Клеточные супернатанты, содержащие рекомбинантное человеческое антитело, были очищены с помощью хроматографии на белке А-сефарозе, и связанное тело элюировалось при добавлении кислотного буфера. Антитела диализовали в PBS.

Способность очищенных CDR-привитых антител связываться с DLL4 или ингибировать активность DLL4 определяли с помощью анализов различных типов, таких как ELISA (Пример 1.2, метод 2), Biacore (Пример 1.2) и проточная цитометрия (FACS) (Пример 1.3). В таблице 12 и в таблице 16 представлены величины EC50, полученные в анализах ELISA и FACS, и аффинности CDR-привитых антител, определенные методом Biacore и описанные, соответственно, в таблице 11 и в таблице 15 для человеческого DLL4, мышиного DLL4 и DLL4 яванского макака. В таблице 13 и в таблице 17 представлены величины IC50, полученные с помощью ELISA-анализа на блокирование (Пример 1.4) и анализа FACS на блокирование (Пример 1.5) человеческого DLL4 и мышиного DLL4 CDR-привитыми антителами, описанными, соответственно, в таблице 11 и в таблице 15.

Таблица 11  
Систематизированные данные полученных и экспрессированных вариантов антитела E9

Антитело	Название VH	Название VL	Титр HEK-293-6e (мг/л)
E9-SE1	E9vh3g2	E9a10vlg2	104
E9-SE2	E9vh3g2	E9.1	87
E9-SE3	E9vh4r2	E9.1	89
E9-SE4	E9.1	E9a10vlg2	66
E9-SE5	E9.1	E9AVK	79
E9-SE6	E9vh4r2	E9a10vlg2	125
E9-SE7	E9vh3g2	E9AVK	56
E9-SE8	E9vh4r2	E9AVK	85

Таблица 12 Аффинности связывания вариантов антитела E9 с человеческим DLL4, мышевым DLL4 и DLL4 яванского макака, определенные с помощью ELISA, Biacore и FACS								
Данные связывания								
	Человеческий DLL4			Мышевый DLL4			DLL4 яванского макака	
5	Антитело	ELISA на связывание (EC50, нМ)	Biacore (Kd, нМ)	FACS на связывание (Kd, нМ)	ELISA на связывание (EC50, нМ)	Biacore (Kd, нМ)	FACS на связывание (Kd, нМ)	ELISA на связывание (EC50, нМ)
	E9-SE1	0,16	15,2*	3,45	0,19	12,83	1,34	0,14
	E9-SE2	0,18	2,43	5,2	0,20	15,09	0,87	0,14
	E9-SE3	0,18	2,26	2,29	0,20	12,1	0,74	0,14
	E9-SE4	0,17	2,38	nc	0,20	10,52	1,15	0,14
	E9-SE5	0,16	1,57	7,81	0,19	12,77	2,9	0,13
	E9-SE6	0,17	0,64	4,25	0,19	10,04	1,18	0,13
	E9-SE7	0,17	1,69	2,28	0,17	16,22	2,24	0,12
	E9-SE8	0,18	2,00	2,67	0,19	13,03	2,32	0,14
	E9.1	0,29	2,38	0,35	0,34	12,77	1,6*	0,24
* уже имеющиеся данные; nc = не вычисляли								

Функциональные данные				
	Человеческий DLL4		Мышевый DLL4	
Антитело	ELISA на блокирование (IC50, нМ)	FACS на блокирование (IC50, нМ)	ELISA на блокирование (IC50, нМ)	FACS на блокирование (IC50, нМ)
15	E9-SE1	2,7	8,51	2,9
	E9-SE2	2,6	5,61	2,2
	E9-SE3	2,5	6,75	2,1
	E9-SE4	2,7	5,82	2,9
	E9-SE5	2,6	6,38	2,4
	E9-SE6	2,5	8,16	2,9
	E9-SE7	2,4	7,81	2,4
	E9-SE8	2,5	9,25	2,6
	E9.1	2,5	4,55	2,5
Таблица 13 Нейтрализующая активность вариантов антитела E9 по отношению к человеческому и мышевому DLL4, определенная с помощью ELISA и FACS				

Таблица 14  
Аминокислотные последовательности VH и VL человеческих CDR-привитых антител E9

30

35

40

45

SEQ ID No.	Область белка		Последовательность
			123456789012345678901234567890
5	334 VH E9.1		EVQLQESGPLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <b>SSSYYWGWIROPPGKGLEWIGDIYYTGSTY</b> <b>YNPSLKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA</b> DTAVYYCAR <b>EDVILRGGSDYWGQGTLVTVS</b> S
10		VH E9.1 CDR-H1	Остатки 31-37 последовательности SEQ ID NO: 334 <b>SSSYYWG</b>
		VH E9.1 CDR-H2	Остатки 52-67 последовательности SEQ ID NO: 334 <b>DIYYTGSTYYNPSLKS</b>
15		VH E9.1 CDR-H3	Остатки 100-110 последовательности SEQ ID NO: 334 <b>EDVILRGGSDY</b>
			123456789012345678901234567890
20	335 VL E9.1		SYELTQPPSVSPGQTASITC <b>SGQRLGDK</b> <b>YASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPER</b> FSGSNNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC <b>QAW</b> <b>DRDTGVFGYGTRVTVLG</b>
		VL E9.1 CDR-L1	SGQRLGDKYAS
		VL E9.1 CDR-L2	<b>EDSKRPS</b>
25		VL E9.1 CDR-L3	<b>QAWDRDTGV</b>
			123456789012345678901234567890
30	336 VH E9-SE1		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSIS <b>SSSYYWGWIROAPGKGLEWIGDIYYTGSTY</b> <b>YNPSLKSRTVTISVDTKNSFYLQMNSLRAE</b> DTAVYYCAR <b>EDVILRGGSDYWGQGTLVTVS</b> S
		VH E9-SE1 CDR-H1	Остатки 31-37 последовательности SEQ ID NO: 336 <b>SSSYYWG</b>
35		VH E9-SE1 CDR-H2	Остатки 52-67 последовательности SEQ ID NO: 336 <b>DIYYTGSTYYNPSLKS</b>
		VH E9-SE1 CDR-H3	<b>EDVILRGGSDY</b>
40	337 VL E9-SE1		123456789012345678901234567890 LYVLTQPPSVSPGQTASITC <b>SGQRLGDK</b> <b>YASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPER</b> FSGSNNSGDTATLTISGTQTMDEADYL <b>CQAW</b> <b>DRDTGVFGGGTKVTVLG</b>

			123456789012345678901234567890
5		VL E9-SE1 CDR-L1	Остатки 23-33 последовательности SEQ ID NO: 337 <b>SGQRLGDKYAS</b>
		VL E9-SE1 CDR-L2	Остатки 49-55 последовательности SEQ ID NO: 337 <b>EDSKRPS</b>
		VL E9-SE1 CDR-L3	Остатки 88-96 последовательности SEQ ID NO: 337 <b>QAWDRDTGV</b>
10			123456789012345678901234567890
	338	<b>VH E9-SE2</b>	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSIS <b>SSSYYWGWIROAPGKGLEWIGDIYYTGSTY</b> <b>YNPSLKS</b> RVTISVDTSKNSFYLQMNSLRAE DTAVYYCAR <b>EDVILRGGSDYWGQGTIVTVS</b> S
15		VH E9-SE2 CDR-H1	Остатки 31-37 последовательности SEQ ID NO: 338 <b>SSSYYWG</b>
		VH E9-SE2 CDR-H2	Остатки 52-67 последовательности SEQ ID NO: 338 <b>DIYYTGSTYYNPSLKS</b>
20		VH E9-SE2 CDR-H3	Остатки 100-110 последовательности SEQ ID SEQ ID NO: 338 <b>EDVILRGGSDY</b>
			123456789012345678901234567890
25	339	<b>VL E9-SE2</b>	SYELTQPPSVSPGQTASITC <b>SGQRLGDK</b> <b>YASWYQQKPGQSPVLIYEDSKRPSGIPER</b> FSGNSNGDTATLTISGTQPMDEADYYC <b>QAW</b> <b>DRDTGVFGYGRTRVTVLG</b>
		VL E9-SE2 CDR-L1	Остатки 23-33 последовательности SEQ ID NO: 339 <b>SGQRLGDKYAS</b>
30		VL E9-SE2 CDR-L2	Остатки 49-55 последовательности SEQ ID NO: 339 <b>EDSKRPS</b>
		VL E9-SE2 CDR-L3	Остатки 88-96 последовательности SEQ ID NO: 339 <b>QAWDRDTGV</b>
			123456789012345678901234567890
35	340	<b>VH E9-SE3</b>	EVOLOESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSIS <b>SSSYYWGWIROAPGKGLEWIGDIYYTGSTY</b> <b>YNPSLKS</b> RVTISVDTSKNQFYLKLLSVRAE DTAVYYCAR <b>EDVILRGGSDYWGQGTIVTVS</b> S
		VH E9-SE3 CDR-H1	Остатки 31-37 последовательности SEQ ID NO: 340 <b>SSSYYWG</b>
40		VH E9-SE3 CDR-H2	Остатки 52-67 последовательности SEQ ID NO: 340 <b>DIYYTGSTYYNPSLKS</b>

			123456789012345678901234567890
5	VH E9-SE3 CDR-H3	Остатки 100-110 последовательности SEQ ID NO: 340	<b>EDVILRGGSDY</b>
10	VL E9-SE3		123456789012345678901234567890  SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDK <b>YASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGI</b> PER FSGSNNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC <b>QAW</b> <b>DRDTGFGYGTRTVLGL</b>
15	VL E9-SE3 CDR-L1	Остатки 23-33 последовательности SEQ ID NO: 341	<b>SGQRLGDKYAS</b>
20	VL E9-SE3 CDR-L2	Остатки 49-55 последовательности SEQ ID NO: 341	<b>EDSKRPS</b>
25	VL E9-SE3 CDR-L3	Остатки 88-96 последовательности SEQ ID NO: 341	<b>QAWDRDTGV</b>
30	VH E9-SE4		123456789012345678901234567890  EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <b>SSSYYWG</b> WIRQPPGKGLEWIG <b>DIYYTGSTY</b> <b>YNPSLKS</b> RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA <b>EDVILRGGSDY</b> WGQGTLVTVS S
35	VH E9-SE4 CDR-H1	Остатки 31-37 последовательности SEQ ID NO: 342	<b>SSSYYWG</b>
40	VH E9-SE4 CDR-H2	Остатки 52-67 последовательности SEQ ID NO: 342	<b>DIYYTGSTYYNPSLKS</b>
	VH E9-SE4 CDR-H3	Остатки 100-110 последовательности SEQ ID NO: 342	<b>EDVILRGGSDY</b>
	VL E9-SE4		123456789012345678901234567890  LYVLTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDK <b>YASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGI</b> PER FSGSNNSGDTATLTISGTQTMDEADYL <b>CQAW</b> <b>DRDTGFGGGTKVTVLG</b>
	VL E9-SE4 CDR-L1	Остатки 23-33 последовательности SEQ ID NO: 343	<b>SGQRLGDKYAS</b>
	VL E9-SE4 CDR-L2	Остатки 49-55 последовательности SEQ ID NO: 343	<b>EDSKRPS</b>
	VL E9-SE4 CDR-L3	Остатки 88-96 последовательности SEQ ID NO: 343	<b>QAWDRDTGV</b>
			123456789012345678901234567890

			123456789012345678901234567890
5	344	VH E9-SE5	EVQLQESGPLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <b>SSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYTGSTY</b> <b>YNPSLKS</b> RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAR <b>EDVILRGGSDY</b> WGQGTLVTVS S
10		VH E9-SE5 CDR-H1	Остатки 31-37 последовательности SEQ ID NO: 344
		VH E9-SE5 CDR-H2	Остатки 52-67 последовательности SEQ ID NO: 344
		VH E9-SE5 CDR-H3	Остатки 100-110 последовательности SEQ ID NO: 344
15	345	VL E9-SE5	123456789012345678901234567890 EVVLTQSPDFQSVPKEKVTITC <b>SGQRLGD</b> <b>KYASWYQQKPDQSPKLVIYEDSKRPSGVPS</b> RFGSNNSGDDATLTINSLEAEDAATYYC <b>QAW</b> <b>WDRDTGTVFGQGTVKVEIKR</b>
20		VL E9-SE5 CDR-L1	SGQRLGDKYAS
		VL E9-SE5 CDR-L2	<b>EDSKRPS</b>
		VL E9-SE5 CDR-L3	<b>QAWDRDTGV</b>
25	346	VH E9-SE6	123456789012345678901234567890 EVQLQESGPLVKPGETLSLTCTVSGGSIS <b>SSSYYWGWIRQAPGKGLEWIGDIYTGSTY</b> <b>YNPSLKS</b> RVTISVDTSKNQFYLKLLSSVRAE DTAVYYCAR <b>EDVILRGGSDY</b> WGQGTLVTVS S
30		VH E9-SE6 CDR-H1	SSSYYWG
		VH E9-SE6 CDR-H2	DIYTGSTYYNPSLKS
35		VH E9-SE6 CDR-H3	<b>EDVILRGGSDY</b>
40	347	VL E9-SE6	123456789012345678901234567890 LYVLTQPPSVSPGQTASITC <b>SGQRLGDK</b> <b>YASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPER</b> FSGSNNSGDTATLTISGTQTMDEADYL <b>CQAW</b> <b>DRDTGVFGGGTKVTVLG</b>

			123456789012345678901234567890
5		VL E9-SE6 CDR-L1	Остатки 23-33 последовательности SEQ ID NO: 347 <b>SGQRLGDKYAS</b>
		VL E9-SE6 CDR-L2	Остатки 49-55 последовательности SEQ ID NO: 347 <b>EDSKRPS</b>
		VL E9-SE6 CDR-L3	Остатки 88-96 последовательности SEQ ID NO: 347 <b>QAWDRDTGV</b>
10	348	VH E9-SE7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSIS <b>SSSYYWG</b> WIRQAPGKGLEWIGDIYYTGSTY <b>YNPSLKS</b> RVTISVDTSKNSFYLQMNSLRAE DTAVYYCAR <b>EDVILRGGSDY</b> WGQGTLVTVS S
15		VH E9-SE7 CDR-H1	Остатки 31-37 последовательности SEQ ID NO: 348 <b>SSSYYWG</b>
		VH E9-SE7 CDR-H2	Остатки 52-67 последовательности SEQ ID NO: 348 <b>DIYYTGSTYYNPSLKS</b>
20		VH E9-SE7 CDR-H3	Остатки 100-110 последовательности SEQ ID NO: 348 <b>EDVILRGGSDY</b>
25	349	VL E9-SE7	123456789012345678901234567890 EVLTQSPDFQSVPKEKVITITCSG <b>QRLGD</b> <b>KYAS</b> WYQQKPDQSPKLVIYE <b>EDSKRPSGVPS</b> RFSGSNSGDDATLTINSLEAEDAATYY <b>CQA</b> <b>WDRDTGVFGQGTKVEIKR</b>
		VL E9-SE7 CDR-L1	Остатки 24-34 последовательности SEQ ID NO: 349 <b>SGQRLGDKYAS</b>
30		VL E9-SE7 CDR-L2	Остатки 50-56 последовательности SEQ ID NO: 349 <b>EDSKRPS</b>
		VL E9-SE7 CDR-L3	Остатки 89-97 последовательности SEQ ID NO: 349 <b>QAWDRDTGV</b>
35	350	VH E9-SE8	123456789012345678901234567890 EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSIS <b>SSSYYWG</b> WIRQAPGKGLEWIGDIYYTGSTY <b>YNPSLKS</b> RVTISVDTSKNQFYLKLSVRAE DTAVYYCAR <b>EDVILRGGSDY</b> WGQGTLVTVS S
		VH E9-SE8 CDR-H1	Остатки 31-37 последовательности SEQ ID NO: 350 <b>SSSYYWG</b>
40		VH E9-SE8 CDR-H2	Остатки 52-67 последовательности SEQ ID NO: 350 <b>DIYYTGSTYYNPSLKS</b>

			123456789012345678901234567890
5		VH E9-SE8 CDR-H3	Остатки 100-110 последовательности SEQ ID NO: 350 <b>EDVILRGGSDY</b>
351		<b>VL E9-SE8</b>	123456789012345678901234567890 EYVLTQSPDFQSVPKEKVTITC <b>SGQLGDKYAS</b> WDRDTGVFGQGTVKVEIKR
10		VL E9-SE8 CDR-L1	Остатки 24-34 последовательности SEQ ID NO: 351 <b>SGQLGDKYAS</b>
		VL E9-SE8 CDR-L2	Остатки 50-56 последовательности SEQ ID NO: 351 <b>EDSKRPS</b>
15		VL E9-SE8 CDR-L3	Остатки 89-97 последовательности SEQ ID NO: 351 <b>QAWDRDTGV</b>

Таблица 15  
Систематизированные данные полученных и экспрессированных вариантов антитела E9

	Антитело	Название VH	Название VL	Титр HEK-293- б6 (мг/л)
20	E9-FR1	E9VH325	E9VL325	29
	E9-FR2	E9VH1D4.1	E9VL1D4.1	44

Таблица 16  
Аффинности связывания CDR-привитых антител E9 с человеческим DLL4, мышевым DLL4 и DLL4 яванского макака, определенные с помощью ELISA, Biacore и FACS

25	Данные связывания							
	MAb	Человеческий DLL4			Мышевый DLL4			DLL4 яванского макака
		ELISA на связывание (EC50, нМ)	Biacore (Kd, нМ)	FACS на связывание (Kd, нМ)	ELISA на связывание (EC50, нМ)	Biacore (Kd, нМ)	FACS на связывание (Kd, нМ)	ELISA на связывание (EC50, нМ)
	E9-FR1	0,11	0,72	4	0,13	1,6	2,51	0,12
30	E9-FR2	0,105	0,31	6,2	0,125	0,69	3,57	0,12
	E9.1	0,03	0,52	3,62	0,04	1,1	1,66	0,035
								0,47

Таблица 17  
Нейтрализующая активность CDR-привитых антител E9 по отношению к человеческому и мышевому DLL4, определенная с помощью ELISA и FACS

35	Функциональные данные				
	MAb	Человеческий DLL4		Мышевый DLL4	
		ELISA на блокирование (IC50, нМ)	FACS на блокирование (IC50, нМ)	ELISA на блокирование (IC50, нМ)	FACS на блокирование (IC50, нМ)
	E9-FR1	1,54	1,57	3,35	0,98
	E9-FR2	1,52	3,03	4,35	1,07
	E9.1	2,2	1,62	5,85	1,06

40 Таблица 18  
Аминокислотные последовательности VH и VL человеческих CDR-привитых антител E9

SEQ ID No.	Область белка		Последовательность
			123456789012345678901234567890
5	352 VH E9-FR1		EVQLVQSGTEVKKPGESELKISCKVSGGSIS <b>SSSYYWG</b> WIRQMPGKGLEWIG <b>DIYYTGSTY</b> <b>YNPSLKS</b> QVTISVDTSFNTFFLQWSSLKAS DTAMYYCAR <b>EDVILRGGSDY</b> WGQGTMVTVS S
10	VH E9-FR1 CDR-H1	Остатки 31-37 последовательности SEQ ID NO: 352	<b>SSSYYWG</b>
	VH E9-FR1 CDR-H2	Остатки 52-67 последовательности SEQ ID NO: 352	<b>DIYYTGSTY</b> <b>NNPSLKS</b>
15	VH E9-FR1 CDR-H3	Остатки 100-110 последовательности SEQ ID NO: 352	<b>EDVILRGGSDY</b>
			123456789012345678901234567890
	353 VL E9-FR1		EYVLTQSPATLSVSPGERATLSC <b>SGQLGKD</b> <b>KYASWYQQKPGQSPRLVIY</b> <b>EDSKRPS</b> DIPA RFSGNSNGDEATLTISSSLQSEDFAVYYCQA <b>WDRDTGVFGQGTRLEIKR</b>
20	VL E9-FR1 CDR-L1	Остатки 24-34 последовательности SEQ ID NO: 353	<b>SGQLGDKYAS</b>
	VL E9-FR1 CDR-L2	Остатки 50-56 последовательности SEQ ID NO: 353	<b>EDSKRPS</b>
25	VL E9-FR1 CDR-L3	Остатки 89-97 последовательности SEQ ID NO: 353	<b>QAWDRDTGV</b>
			123456789012345678901234567890
30	354 VH E9-FR2		EVTLRESPALVKPTQTLTCTVSGGSIS <b>SSSYYWG</b> WIRQPPGKGLEWIG <b>DIYYTGSTY</b> <b>YNPSLKS</b> RTVTISVDTSKNQFVLTMTNMDPV DTATYYCAR <b>EDVILRGGSDY</b> WGQGTTVTVS S
	VH E9-FR2 CDR-H1	Остатки 31-37 последовательности SEQ ID NO: 354	<b>SSSYYWG</b>
35	VH E9-FR2 CDR-H2	Остатки 52-67 последовательности SEQ ID NO: 354	<b>DIYYTGSTY</b> <b>NNPSLKS</b>
	VH E9-FR2 CDR-H3	Остатки 100-110 последовательности SEQ ID NO: 354	<b>EDVILRGGSDY</b>
40			123456789012345678901234567890
	355 VL E9-FR2		DYVLTQSPDSLAVSLGERATINC <b>SGQLGKD</b> <b>KYASWYQQKPGQSPKLVIY</b> <b>EDSKRPS</b> GIPD RFSGNSNGDDATLTISSLQAEDVAVYYCQA <b>WDRDTGVFGGGTKVEIKR</b>

			123456789012345678901234567890
5	VL E9-FR2 CDR-L1	Остатки 24-34 последовательности SEQ ID NO: 355	<b>SGQRLGDKYAS</b>
	VL E9-FR2 CDR-L2	Остатки 50-56 последовательности SEQ ID NO: 355	<b>EDSKRPS</b>
	VL E9-FR2 CDR-L3	Остатки 89-97 последовательности SEQ ID NO: 355	<b>QAWDRDTGV</b>

10 Пример 6: Дальнейшее конструирование аффинно зрелого антитела E9-71  
E9-71(M) и E9-71(L)

Было проведено дальнейшее конструирование тяжелой и легкой цепей аффинно зрелого анти-DLL4 антитела E9-71. Метионин (M) в CDR-H3 тяжелой цепи E9-71 заменили лейцином (L) путем конструирования прямых и обратных перекрывающихся праймеров, 15 содержащих мутированные нуклеотиды. Затем проводили последовательную двухстадийную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для амплификации полноразмерного гена вариабельной области с использованием двух праймеров, несущих мутированные нуклеотиды, и двух самых крайних праймеров, содержащих выступающие последовательности, комплементарные полученному вектору.

20 Сигнальный пептид, используемый для легкой цепи E9-71 (M) и E9-71 (L), называется сигнальным пептидом лямбда 1а. Каркасную область 4 (FW4) hJL-1 легкой цепи E9-71 заменили областью hJL2 для сообщения ей большей совместимости с константной областью huCL2 антитела. Затем конструировали прямые и обратные праймеры, 25 содержащие мутированные нуклеотиды. Затем проводили последовательную двухстадийную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для амплификации полноразмерного гена вариабельной области с использованием двух праймеров, несущих мутированные нуклеотиды, и двух самых крайних праймеров, содержащих выступающие последовательности, комплементарные полученному вектору.

30 ПЦР-продукты, полученные после проведения каждой сборки кДНК, разделяли на агарозном геле, и полосу, соответствующую предсказанной кДНК вариабельной области, вырезали по размеру и очищали. Вариабельную область тяжелой цепи встраивали, с сохранением рамки считывания, в кДНК-фрагмент, кодирующий константную область человеческого IgGl, содержащую две аминокислотные мутации в шарнирной области, путем гомологичной рекомбинации в бактериях. Такими 35 мутациями являются замена лейцина аланином в положении 234 (в соответствии с Европейской системой нумерации) и замена лейцина аланином в положении 235 (Lund et al., *J. Immunol.*, 147: 2657 (1991)). Вариабельную область легкой цепи встраивали, с сохранением рамки считывания, между человеческим сигнальными пептидом лямбда 1а и человеческой константной областью лямбда посредством гомологичной 40 рекомбинации. Бактериальные колонии выделяли, плазмидную ДНК экстрагировали и кДНК-вставку секвенировали кДНК по всей длине. «Правильные» тяжелые и легкие цепи, соответствующие каждому антителу (таблица 19), совместно переносили в клетки HEK-293-6E для кратковременного продуцирования полноразмерных антител против человеческого DLL4, E9-71(M) или E9-71(L). Оба эти антитела E9.71(M) и E9.71(L) имели 45 одну и ту же легкую цепь. Клеточные супернатанты, содержащие рекомбинантное человеческое антитело, были очищены с помощью хроматографии на белке А-сепарозе и связанное тело элюировалось при добавлении кислотного буфера. Антитела нейтрализовали и диализовали в PBS.

Таблица 19  
Аминокислотные последовательности VH и VL человеческих сконструированных антител E9.71

	SEQ ID No.	Область белка	Последовательность
5			123456789012345678901234567890
	356	<b>VH E9.71</b>	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <b>SSSSYYWG</b> WIRQPPGKGLEWIG <b>DIYYTGSTY</b> <b>YNPSLKS</b> RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAR <b>QALAMGGGSDK</b> WGQQGTLVTVS S
10		VH E9.71 CDR-H1	Остатки 31-37 последовательности SEQ ID NO: 356
		VH E9.71 CDR-H2	Остатки 52-67 последовательности SEQ ID NO: 356
15		VH E9.71 CDR-H3	Остатки 100-110 последовательности SEQ ID NO: 356
20	357	<b>VL E9.71</b>	123456789012345678901234567890 SYELTQPPSVSPGQTASITC <b>SGQRLGDK</b> <b>YASWYQQKPGQSPVLVIYE</b> DSKRPSGI PER FSGSNNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC <b>QAW</b> <b>DRDTGTVFGYGTKVTVLG</b>
		VL E9.71 CDR-L1	Остатки 23-33 последовательности SEQ ID NO: 357
25		VL E9.71 CDR-L2	Остатки 49-55 последовательности SEQ ID NO: 357
		VL E9.71 CDR-L3	Остатки 88-96 последовательности SEQ ID NO: 357
30	358	<b>VH E9.71 (M)</b>	123456789012345678901234567890 EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <b>SSSSYYWG</b> WIRQPPGKGLEWIG <b>DIYYTGSTY</b> <b>YNPSLKS</b> RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAR <b>QALAMGGGSDK</b> WGQQGTLVTVS S
		VH E9.71 (M) CDR-H1	Остатки 31-37 последовательности SEQ ID NO: 358
35		VH E9.71 (M) CDR-H2	Остатки 52-67 последовательности SEQ ID NO: 358
		VH E9.71 (M) CDR-H3	Остатки 100-110 последовательности SEQ ID NO: 358
40			123456789012345678901234567890

			123456789012345678901234567890
5	359	VL E9.71 (M)	SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDK YASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPER FSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAW DRDTGVFGGGTKLTVLG
		VL E9.71 (M) CDR-L1	Остатки 23-33 последовательности SEQ ID NO: 359
10		VL E9.71 (M) CDR-L2	Остатки 49-55 последовательности SEQ ID NO: 359
		VL E9.71 (M) CDR-L3	Остатки 88-96 последовательности SEQ ID NO: 359
15	360	VH E9.71 (L)	123456789012345678901234567890 EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SSSYYWGIRQPPKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRTISVDTSKNQFSKLSSVTAA DTAVYYCARQALALGGGSDKWGQGTLTVVS S
		VH E9.71 (L) CDR-H1	Остатки 31-37 последовательности SEQ ID NO: 360
20		VH E9.71 (L) CDR-H2	Остатки 52-67 последовательности SEQ ID NO: 360
		VH E9.71 (L) CDR-H3	Остатки 100-110 последовательности SEQ ID NO: 360
25	361	VL E9.71 (L)	123456789012345678901234567890 SYELTQPPSVSPGQTASITCSGQRLGDK YASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPER FSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAW DRDTGVFGGGTKLTVLG
30		VL E9.71 (L) CDR-L1	Остатки 23-33 последовательности SEQ ID NO: 361
		VL E9.71 (L) CDR-L2	Остатки 49-55 последовательности SEQ ID NO: 361
35		VL E9.71 (L) CDR-L3	Остатки 88-96 последовательности SEQ ID NO: 361

### Пример 7: Конструирование сигнального пептида E9-71(M)

Для генерирования анти-DLL4 антитела E9-71(M) использовали сигнальный пептид лямбда 1а. Были также исследованы альтернативные сигнальные пептиды.

- 40 Предположительные данные относительно процента «правильного» расщепления антитела в процессе экспрессии *in silico* сконструированных аминокислотных последовательностей N-концевой вариабельной области E9-71(M) с различными сигнальными пептидами, происходящими от семейства сигнальных пептидов лямбда и каппа, могут быть найдены в Интернете с помощью сервера Signal IP 3.0 (например, 45 на web-сайте [cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://cbs.dtu.dk/services/SignalP/)) или с использованием других эквивалентных компьютерных программ. Были выбраны сигнальные пептиды, предположительно, с наиболее высоким процентом «правильного» отщепления, по одному от каждого семейства: пептид лямбда 3р, принадлежащий к семейству лямбда, и пептид L23,

принадлежащий к семейству каппа. Был также выбран мутированный вариант, происходящий от исходного сигнального пептида лямбда 1а, с двумя аминокислотными заменами (глицина на аргинин и серина на валин). Для конструирования легкой цепи, содержащей сигнальный пептид лямбда 1а, осуществляли одностадийную полимеразную 5 цепную реакцию (ПЦР) для амплификации полноразмерного гена вариабельной области с использованием двух самых крайних праймеров, содержащих выступающие последовательности, комплементарные «принимающему» вектору, где один из них содержит мутированную нуклеотидную последовательность. Для получения легкой цепи, содержащей сигнальный пептид лямбда 3р и сигнальный пептид каппа L23, были 10 созданы два перекрывающихся праймера в целях конструирования области сигнального пептида, а затем была проведена полимеразная цепная реакция (ПЦР) для амплификации полноразмерного гена вариабельной области с использованием двух самых крайних праймеров, содержащих выступающие последовательности, комплементарные «принимающему» вектору. С использованием сигнальных пептидов лямбда 3р и каппа 15 L23 были получены два варианта вариабельных областей E9-71, где один из них имел полноразмерную вариабельную область, а другой - вариабельную область, в которой отсутствовал первый серин (S) у N-конца. Сигнальный пептид лямбда 1а присутствовал только в сконструированной полноразмерной вариабельной области. ПЦР-продукты, полученные после каждой сборки кДНК, разделяли на агарозном геле, и полосу, размер 20 которой соответствовал предсказанной кДНК вариабельной области, вырезали и очищали. Вариабельную область тяжелой цепи встраивали с сохранением рамки считывания в кДНК-фрагмент, кодирующий константную область человеческого IgGl, содержащую две аминокислотных мутации в шарнирной области, путем гомологичной рекомбинации в бактериях. Такими мутациями являются замена лейцина аланином в 25 положении 234 (в соответствии с Европейской системой нумерации) и замена лейцина аланином в положении 235 (Lund et al., *J. Immunol.*, 147: 2657 (1991)). Вариабельную область легкой цепи с человеческой константной областью лямбда встраивали, с сохранением рамки считывания, посредством гомологичной рекомбинации. 30 Бактериальные колонии выделяли, плазмидную ДНК экстрагировали, и кДНК-вставку секвенировали по всей ее длине. «Правильные» тяжелые и легкие цепи, соответствующие каждому антителу (таблица 19), совместно переносили в клетки HEK-293-6E для кратковременного производства полноразмерных антител против человеческого DLL4, E9-71(M). Клеточные супернатанты, содержащие рекомбинантное человеческое 35 антитело, очищали с помощью хроматографии на белке A-сефарозе и связанное антитело элюировалось при добавлении кислотного буфера. Антитела диализовали в PBS. Очищенное антитело E9.71(M) анализировали с помощью масс-спектрометрии (МС) для подтверждения последовательности интактного антитела. В таблице 20, приведенной ниже, представлены аминокислотные последовательности различных сигнальных пептидов, используемых для получения антитела E9.71(M). В таблице 21, приведенной 40 ниже, представлены сайты расщепления антитела E9.71(M), проанализированные с помощью масс-спектрометрии.

Таблица 20  
Аминокислотные последовательности сигнальных пептидов, используемых для конструирования E9.71(M)

Антитело	Сигнальный пептид	Последовательность сигнального пептида	Область VL
E9.71(M)	λ 1a	MAWSPLFLTLITHCAGSWA (SEQ ID NO:362)	Полноразмерная
E9.71(M)-1	λ 1a (GS to RV)	MAWSPLFLTLITHCARVWA (SEQ ID NO:363)	
E9.71(M)-2	λ 3p	MAWTPLLLPLLTFCCTVSEA (SEQ ID NO:364)	
E9.71(M)-3	λ 3p	MAWTPLLLPLLTFCCTVSEA (SEQ ID NO:365)	N-концевой S отсутствует
E9.71(M)-4	Kappa L23	MDMRVPAQRLGLLLLWFPGARC (SEQ ID NO:366)	
E9.71(M)-5	Kappa L23	MDMRVPAQRLGLLLLWFPGARC (SEQ ID NO:367)	N-концевой S отсутствует

Таблица 21  
Сайты расщепления антитела E9.71(M), проанализированные с помощью масс-спектрометрии (MC)

Антитело	Главный сайт расщепления антитела	% главного пика (↓)
E9.71(M)	MAWSPLFLTLITHCAG↓SWA↓SYELTQPPSVS (SEQ ID NO:368)	95
E9.71(M)-1	MAWSPLFLTLITHCARVWA↓SYELTQPPSVS (SEQ ID NO:369)	96
E9.71(M)-2	MAWTPLLLPLLTFCCTVSEA↓SYELTQPPSVS (SEQ ID NO:370)	96
E9.71(M)-3	MAWTPLLLPLLTFCCTVSEA↓YELTQPPSVS (SEQ ID NO:371 )	97
E9.71(M)-4	MDMRVPAQRLGLLLLWFPGARC↓SYELTQPPSVS (SEQ ID NO:372)	Не определяли
E9.71(M)-5	MDMRVPAQRLGLLLLWFPGARC↓YELTQPPSVS (SEQ ID NO:373)	Не определяли

#### Пример 8. Характеризация *in vitro* сконструированных антител PROfusion

Аффинность связывания сконструированных антител PROfusion с антигеном определяли с применением BIACORE-технологии, как описано в примере 1.1., и эти данные представлены ниже в таблице 22. *In vitro* активность репрезентативных антител также оценивали другими методами, описанными в примере 1, и результаты такой оценки представлены в таблице 23.

Таблица 22  
Кинетика связывания сконструированных анти-DLL4 антител PROfusion, оцениваемая методом Biacore

Антитело	Кинетика связывания								
	ECD человеческого DLL4			ECD мышиного DLL4			ECD DLL4 яванского макака		
	K <sub>a</sub> ( $\text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$ ) E+04	K <sub>d</sub> ( $\text{c}^{-1}$ ) E-05	K <sub>D</sub> ( $\text{nM}$ )	K <sub>a</sub> ( $\text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$ ) E+04	K <sub>d</sub> ( $\text{c}^{-1}$ ) E-05	K <sub>D</sub> ( $\text{nM}$ )	K <sub>a</sub> ( $\text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$ ) E+04	K <sub>d</sub> ( $\text{c}^{-1}$ ) E-05	K <sub>D</sub> ( $\text{nM}$ )
E9.4	5.67	3.31	0.58	5.38	6.01	1.12	1.37	3.44	0.25
E9.11	3.63	1.74	0.48	2.77	1.39	0.5	5.31	0.89	0.17
E9.14	3.99	36.5	9.14	3.89	13.6	3.49	5.72	38.6	6.75
E9.17	4.39	0.44	0.1	3.7	1.41	0.38	7.51	1.23	0.16
E9.18	1.57	1.84	1.18	2.32	1.68	0.73	2.63	2.63	1

	E9.19	7.49	5.17	0.69	6.7	20.6	3.07	1.92	4.86	0.25
5	E9.22	3.91	33.1	8.46	3.78	13.3	3.5	5.62	35.2	6.26
	E9.48	1.1	7.59	6.92	1.65	4.17	2.53	1.68	7.91	4.71
	E9.65	2.59	36.3	14	2.57	13.6	5.27	3.21	41.4	12.9
10	E9.66	3.26	0.25	0.078	2.89	1.44	0.50	6.55	0.91	0.14
	E9.71	3.88	3.51	0.91	3.55	21.6	6.08	7.75	3.79	0.49
15	E9.13	3.74	4.97	1.33	4.34	21.2	4.89	7.92	4.95	0.63
	E9.16	1.29	3.15	2.45	1.83	14.8	8.1	2.49	3.79	1.52
	E9-38	1.27	3.48	2.75	1.84	17.1	9.27	2.42	3.47	1.44
20	E9.2B	35.6	0.79	0.02	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	E9.1F	21.8	1.16	0.05	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	E9-12B	15.1	0.31	0.02	8.35	1.47	0.18	N/D	N/D	N/D
25	E9-10H	10.4	5.9	0.57	6.53	2.23	0.34	N/D	N/D	N/D
	E9-5E	15	0.6	0.04	8.9	0.2	0.02	N/D	N/D	N/D
	E9-10C	12	4.59	0.38	7.37	12.1	1.6	N/D	N/D	N/D
	E9-10E	21.8	4.62	0.21	15.1	9.41	0.62	N/D	N/D	N/D
30	E9-7E	15.2	4.12	0.27	9.53	22.1	2.3	N/D	N/D	N/D
	A10.K30	3.57	27.4	7.69	NB	NB	NB	N/D	N/D	N/D
	A10.K42	10	40.6	4.06	NB	NB	NB	N/D	N/D	N/D
35	A10.L45	4.4	3.16	0.72	NB	NB	NB	N/D	N/D	N/D
	A10.L73	5.07	0.95	0.19	NB	NB	NB	N/D	N/D	N/D

MAb = моноклональное антитело; N/D = не определяли; NB = не связывается

35 Таблица 23  
Характеризация отобранных сконструированных анти-DLL4 антитела PROfusion

Антитело	Анализы на прямое связывание				Анализы на функциональное блокирование						Ингибирование активации Notch в сокультуре huDLL4-клеток (IC <sub>50</sub> , нМ)		
	ELISA с захватом (EC <sub>50</sub> , нМ)			FACS (EC <sub>50</sub> , нМ)		ELISA на конкурентное связывание (IC <sub>50</sub> , нМ)			FACS на конкурентное связывание (IC <sub>50</sub> , нМ)				
	ECD DLL4		DLL4-клетки		ECDDLL4/huNotch-1			huNotch-1/DLL4-клетки					
	hu	mu	cyno	hu	mu	hu	mu	cyno	hu	mu			
40	E9-2B	0,16	0,16	0,45	1,78	0,35	2,3	2,8	2,2	2,63	0,34	2,1	
	E9-71	0,16	0,17	0,44	1,82	0,32	2,0	1,3	2,0	3,22	0,24	2,1	
	E9-19	0,17	0,17	0,46	2,79	0,54	1,8	1,3	1,5	4,90	0,44	4,4	
	E9-4	N/D	N/D	N/D	1,63	0,63	N/D	N/D	N/D	4,3	0,3	N/D	
45	E9-11	N/D	N/D	N/D	4,46	1,45	N/D	N/D	N/D	14,75	2,06	N/D	
	E9-16	N/D	N/D	N/D	1,7	>50	N/D	N/D	N/D	12,6	1,1	N/D	
	E9-17	N/D	N/D	N/D	8	2,57	N/D	N/D	N/D	19,79	N/D	1	
	E9-22	N/D	N/D	N/D	34,34	37,35	N/D	N/D	N/D	21,05	2,63	N/D	

E9-38	N/D	N/D	N/D	1,66	0,13	N/D	N/D	N/D	7,76	1,2	N/D
-------	-----	-----	-----	------	------	-----	-----	-----	------	-----	-----

	E9-48	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	9,12	1,3	N/D
	E9-66	N/D	N/D	N/D	2,02	0,7	N/D	N/D	5,03	0,99	N/D
	E9-1F	N/D	N/D	N/D	2,65	0,37	N/D	N/D	6,55	0,65	N/D
	E9-5E	N/D	N/D	N/D	2,7	0,89	N/D	N/D	3,76	0,34	N/D
	E9-7E	N/D	N/D	N/D	4,46	1,94	N/D	N/D	4	0,33	0,41
5	E9-10C	N/D	N/D	N/D	3,15	0,88	N/D	N/D	3,03	0,26	0,85
	E9-10E	N/D	N/D	N/D	5,1	1,19	N/D	N/D	3,83	0,36	N/D
	E9-10H	N/D	N/D	N/D	3,52	0,82	N/D	N/D	5,65	0,6	N/D
	E9-12B	N/D	N/D	N/D	3,34	0,71	N/D	N/D	4,44	0,37	N/D
	E9-71(M)	N/D	N/D	N/D	0,27	0,29	N/D	N/D	2,12	0,18	N/D
10	E9-71(L)	N/D	N/D	N/D	0,22	0,47	N/D	N/D	1,82	0,21	2,4
	E9-71(M)-3	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0,65

hu = человеческие; mu = мышиные; суло = яванского макака; N/D = не определяли.

#### Пример 8: Физико-химические свойства выбранных антител PROfusion

Идентичность моноклональных антител, специфичных к DLL4, определяли с помощью масс-спектрометрии, описанной ниже.

##### Масс-спектрометрический анализ E9-71

Анализ молекулярной массы легкой цепи и тяжелой цепи: Образец E9-71 разводили до 1 мг/мл путем добавления воды Milli-Q. К 20 мкл разведенного образца добавляли 1 мкл 1М DTT. Образец инкубировали при 37°C в течение 30 минут. 1 мкл восстановленных образцов впрыскивали в ЖХ/МС-систему Agilent 6510 Q-TOF,

снабженную упакованной дифенилом колонкой Varian Diphenyl. Буфер А представляет собой 0,02% трифтормукусную кислоту (TFA), 0,08% муравьиную кислоту (FA) в воде. Буфер В представляет собой 0,02% TFA, 0,08% FA в ацетонитриле. Исходный градиент составлял 5% В, а затем его увеличивали до 35% В за 5 минут и до 38% В за 15 минут. После этого градиент увеличивали до 95% В за 1 минуту и удерживали при 95% В в

течение 4 минут, а затем снижали до 5% В за 1 минуту. Скорость потока составляла 50 мкл/мин. Масс-спектрометр работал при напряжении распыления 5 кВ, а интервалы сканирования составляли 600:3200 (отношение масса:заряд). Молекулярная масса легкой цепи 22649 дальтон четко соответствует теоретической величине для легкой цепи, где у N-конца присутствует аминокислота Y. Три небольших пика наблюдались

при молекулярных массах 22014 дальтон, 22737 дальтон и 22937 дальтон. Пик при 22014 дальтон соответствовал N-концевому фрагменту, состоящему из 6 аминокислот. Этот пик, по всей вероятности, возник в результате фрагментации полноразмерной легкой цепи в ионном источнике, поскольку снижение «величины фрагмента» в масс-

спектрометре приводило к исчезновению этого пика. 22737 дальтон соответствовал теоретической величине для легкой цепи с аминокислотой S, присутствующей у N-конца. 22937 дальтон соответствовал легкой цепи с сигнальным пептидом, удлиненным на аминокислоты «LS» на N-конце. Молекулярные массы тяжелой цепи хорошо соответствовали теоретическим величинам. Наблюдаемые молекулярные массы составляли 50263 дальтон, 50426 дальтон и 50588 дальтон, где разница в 162 дальтон

является результатом различия в гликозилировании.

##### Масс-спектрометрический анализ E9-71(M)

Метод, описанный в разделе «Масс-спектрометрический анализ E9-71», был использован для анализа образца E9-71(M). Молекулярная масса легкой цепи, равная 22645 дальтон, хорошо соответствовала теоретической величине, полученной для легкой цепи с аминокислотой S, присутствующей у N-конца. Небольшой пик, наблюдавшийся для молекулярной массы 22989 дальтон, соответствовал легкой цепи с сигнальным пептидом, удлиненным на аминокислоты «SWA» у N-конца. Наблюдался также очень небольшой пик с молекулярной массой 21923 дальтон, хотя, по всей вероятности, он

возник в результате фрагментации полноразмерной легкой цепи в ионном источнике, поскольку снижение «величины фрагмента» в масс-спектрометре приводило к исчезновению этого пика. Молекулярные массы тяжелой цепи хорошо соответствовали теоретическим величинам. Наблюдаемые молекулярные массы составляли 50263  
 5 дальтон, 50426 дальтон и 50588 дальтон, где разница в 162 дальтон является результатом различия в гликозилировании.

#### **Масс-спектрометрический анализ E9-71(L)**

Метод, описанный в разделе «Масс-спектрометрический анализ E9-71», был использован для анализа образца E9-71(L). Молекулярная масса легкой цепи, равная 10 22645 дальтон, хорошо соответствовала теоретической величине, полученной для легкой цепи с аминокислотой S, присутствующей у N-конца. Небольшой пик, наблюдаемый для молекулярной массы 22989 дальтон, соответствовал легкой цепи с сигнальным пептидом, удлиненным на аминокислоты «SWA» у N-конца. Наблюдался также очень 15 небольшой пик с молекулярной массой 21923 дальтон, хотя, по всей вероятности, он возник в результате фрагментации полноразмерной легкой цепи в ионном источнике, поскольку снижение «величины фрагмента» в масс-спектрометре приводило к исчезновению этого пика. Молекулярные массы тяжелой цепи хорошо соответствовали теоретическим величинам. Наблюдаемые молекулярные массы составляли 50245  
 20 дальтон, 50407 дальтон и 50569 дальтон, где разница в 162 дальтон является результатом различия в гликозилировании.

#### **Масс-спектрометрический анализ E9-71(M)-3**

Метод, описанный в разделе «Масс-спектрометрический анализ E9-71», был использован для анализа образца E9-71(M)-3. Молекулярная масса легкой цепи, равная 22558 дальтон, хорошо соответствовала теоретической величине. Наблюдался также 25 очень небольшой пик с молекулярной массой 21923 дальтон, хотя, по всей вероятности, он возник в результате фрагментации полноразмерной легкой цепи в ионном источнике, поскольку снижение «величины фрагмента» в масс-спектрометре приводило к исчезновению этого пика. Молекулярные массы тяжелой цепи хорошо соответствовали теоретическим величинам. Наблюдаемые молекулярные массы составляли 50263  
 30 дальтон, 50426 дальтон и 50588 дальтон, где разница в 162 дальтон является результатом различия в гликозилировании.

Растворимость антител оценивали путем преципитации полиэтиленгликолем (ПЭГ) 3000. Такая растворимость, то есть истинная растворимость, была определена прямым методом путем концентрирования антител в специальном растворе и/или буфере с 35 помощью центрифужных фильтров Amicon с последующим мониторингом какой-либо преципитации при 25°C и 5°C. Стабильность оценивали методом спектроскопии в ближнем ультрафиолете - круговой поляризации (УФ-КД) и методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Стабильность при замораживании и оттаивании и при повышенных температурах (ускоренный тест на стабильность) оценивали с 40 помощью эксклюзионной хроматографии (ЭХ). Эти методы подробно описаны в примере 1.8, а результаты описаны ниже, в разделе: Оценка растворимости по результатам ПЭГ-преципитации.

В таблицах 24 и 26 указан процент ПЭГ 3000, необходимый для индуцирования преципитации серии клонов E9. Эти клоны и эталонный адалимумаб приготавливали 45 в концентрации 0,2 мг/мл. В соответствии с этими результатами было установлено, что клоны, такие как E9-4, E9-14, E9-22 и E9-19, имели растворимость, аналогичную растворимости адалимумаба (приблизительно 200 мг/мл), а такие клоны, как E9-11 и E9-17, оценивали как клоны, обладающие гораздо меньшей растворимостью.

В таблице 25 указан процент ПЭГ 3000, необходимый для индуцирования преципитации серии стабильных сконструированных клонов Е9. Эти клоны и эталонный адалимумаб приготавливали в концентрации 0,2 мг/мл. В соответствии с этими результатами было установлено, что клоны Е9-SE1 в данной серии имели самую высокую растворимость, но при этом не предполагалось, что их растворимость будет аналогична растворимости адалимумаба (приблизительно 200 мг/мл), и такие клоны, как Е9-SE5, имели гораздо меньшую растворимость.

Таблица 24  
Процент ПЭГ 3000, необходимый для индуцирования преципитации серии антител Е9.  
(Антитела приготавливали в концентрации 0,2 мг/мл)

А-номер	Партия #	Антитело	% ПЭГ 3000
A-1242367.0	1718299	DLL4-E9-11 hIgG1/L	3.00
A-1242368.0	1718300	DLL4-E9-17 hIgG1/L	3.00
		E9.1 IgG2	3.00
A-1242369.0	1718301	DLL4-E9-18 hIgG1/L	4.00
A-1242370.0	1718302	DLL4-E9-48 hIgG1/L	4.00
		E9.1 IgG4	5.00
		DLL4-E9-3 hIgG/L	6.00
A-1242371.0	1718303	DLL4-E9-66 hIgG1/L	8.00
A-1241120.0	1716682	DLL4-E9-16 hIgG1/L	10.00
A-1242795.0	1718785	DLL4-E9-13 hIgG1/L	10.00
A-1241121.0	1716683	DLL4-E9-38 hIgG1/L	11.00
A-1242800.0	1718790	DLL4-E9-71 hIgG1/L	11.00
A-1242794.0	1718784	DLL4-E9-4 hIgG1/L	12.00
A-1242796.0	1718786	DLL4-E9-14 hIgG1/L	12.00
A-1242798.0	1718788	DLL4-E9-22 hIgG1/L	12.00
A-1242797.0	1718787	DLL4-E9-19 hIgG1/L	14.00
		адалимумаб	14.00

Таблица 25  
Процент ПЭГ 3000, необходимый для индуцирования преципитации серии стабильных сконструированных антител Е9. (Антитела приготавливали в концентрации 0,2 мг/мл)

Антитело	% ПЭГ 3000
E9-SE5	6,00
E9-SE7	7,00
E9-SE4	7,50
E9-SE8	7,50
E9-SE2	9,00
E9-SE3	9,00
E9-SE6	9,50
E9-SE1	10,00
(+)E9.1	9,00
(+)E9	10,50
адалимумаб	13,00

Таблица 26  
Процент ПЭГ 3000, необходимый для индуцирования преципитации серии антител Е9. (Антитела приготавливали в концентрации 0,2 мг/мл)

Антитело	% ПЭГ 3000
E9-2B	8,00
E9-1F	8,00
E9	10
адалимумаб	14

Результаты скрининга на истинную растворимость: Е9, Е9-19, Е9-71, Е9-2B, Е9-1F. Были получены растворы, содержащие 12 мг Е9, Е9-71, Е9-1F и Е9-19 и 5,5 мг Е9-2B.

E9 представляет собой IgG1 мутантного изотипа. Объемы всех растворов снижали до величины ниже 1 мл путем ультрацентрифугирования 15-миллилитровых пробирок на центрифуге Amicon 30K.

После проведения этой стадии получали следующие антитела: E9-2B и E9-19, которые

<sup>5</sup> были прозрачными, и E9, E9-71 и E9-1F, которые были слегка мутноватыми.

В каждую пробирку добавляли 10 мл 15 мМ гистидинового буфера при pH 5,03, и растворы снова концентрировали до 1 мл. Затем эти растворы переносили в 4-миллилитровые пробирки Amicon 30K и концентрировали до самого низкого объема, насколько это возможно.

10 После проведения этой стадии при комнатной температуре получали следующие антитела:

E9: 163 мг/мл; объем=0,05 мл; pH=5,12;

E9-19: 132 мг/мл; объем=0,05 мл; pH=5,06;

E9-71: 193 мг/мл; объем=0,05 мл; pH=5,32;

15 E9-2B: 64 мг/мл; объем=0,1 мл; pH=5,29;

E9-1F: 100 мг/мл; объем=0,1 мл; pH=5,31.

Для концентрирования антител E9-2B и E9-1F потребовалось гораздо большее количество времени, чем для трех остальных. Это позволяет предположить, что их вязкость является высокой в условиях приготовления составов.

20 Затем растворы оставляли на два дня при 5°C для оценки растворимости при этой температуре. Были получены следующие антитела:

E9: оставалось прозрачным при 5°C и при доведении до комнатной температуры,

E9-71: оставалось прозрачным при 5°C и при доведении до комнатной температуры,

E9-1F: обнаруживало очень незначительную мутность при 5°C и становилось

25 прозрачным после доведения до комнатной температуры через 20 минут,

E9-2B: обнаруживало незначительную мутность при 5°C и становилось прозрачным после доведения до комнатной температуры через 20 минут,

E9-19: обнаруживало явную мутность при 5°C и становилось прозрачным после доведения до комнатной температуры через 20 минут.

### 30 Результаты скрининга на истинную растворимость E9-71

4 мг E9-71 в растворе концентрировали с использованием центрифужных фильтров Amicon до 60 мг/мл. Какого-либо осаждения или помутнения не наблюдалось ни при 25°C, ни после хранения в течение 1 дня при 5°C.

Характеризация третичной структуры по результатам спектроскопии кругового дихроизма в ближнем диапазоне УФ-излучения.

Спектроскопию кругового дихроизма в ближнем УФ-диапазоне осуществляли для образцов E9, E9-19, E9-71, E9-2B и E9-1F при 1 мг/мл. Спектры обнаруживали сигмоидальные профили, обычно наблюдаемые для «правильно» уложенных антител. Этим методом не было обнаружено какой-либо неправильной укладки антител.

40 Характеризация внутренней стабильности методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).

ДСК осуществляли на образцах E9, E9-19, E9-71, E9-2B и E9-1F в концентрации 1 мг/мл. Результаты представлены в таблице 27. Сначала определяли температуру, при которой начинается разворачивание. Кроме того, антитело IgG обычно проходит три

45 фазы разворачивания (T<sub>m</sub>): разворачивание интактного антитела, которое ассоциируется с плавлением домена CH2 в Fc-фрагменте; плавление домена CH3 в Fc-фрагменте; и плавление Fab-фрагмента. Предварительные величины позволили предположить, что наиболее стабильными являются антитела E9, E9-19 и E9-71. Обычно клоны, имеющие

более высокие величины Т<sub>m</sub>, являются более предпочтительными, чем клоны с более низкими величинами.

Таблица 27  
Внутренняя стабильность клонов анти-DLL4 антитела E9, определенная методом ДСК при 1 мг/мл

Антитело	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)	Исходные величины (°C)
E9	64.45	72.12	80.04	54
E9-19	65.66	77	---	56
E9-71	65.65	75.36	81.24	54
E9-2B	64.74	80.58	83.27	52.5
E9-1F	63.84	80.51	83.26	51.3

### Оценка устойчивости к стрессу в условиях замораживания-оттаивания

Устойчивость к стрессу в условиях замораживания-оттаивания оценивали для образцов E9, E9-19, E9-71, E9-2B и E9-1F в концентрации 1 мг/мл. В таблице 28 представлены результаты ЭХ-анализа образцов после проведения пяти циклов замораживания-оттаивания. Все протестированные антитела оказались устойчивыми к стрессу в условиях замораживания-оттаивания. Какой-либо явной потери мономеров не наблюдалось даже после проведения 5 циклов замораживания-оттаивания.

Таблица 28 Процент мономерных молекул, количественно определенных с помощью ЭХ перед замораживанием при -80°C и после проведения пяти циклов замораживания при -80°C и оттаивания при 30°C на водяной бане для клонов анти-DLL4 антител		
Антитело	% мономеров перед замораживанием	% мономеров после проведения 5 циклов замораживания-оттаивания
E9	99,2	99,3
E9-19	99,3	99,1
E9-71	96,9	96,8
E9-2B	99,0	98,9
E9-1F	98,6	98,5

### Оценка стабильности при повышенных температурах (ускоренная оценка стабильности)

Стабильность при повышенных температурах оценивали для образцов E9, E9-19, E9-71, E9-2B и E9-1F при концентрации 1 мг/мл. В таблице 29 представлены результаты ЭХ-анализа образцов на время 0, и через 7 дней и 21 день при 40°C и 50°C. Кинетика расщепления для всех антител показала приблизительно 8%-ое снижение процента мономеров через 21 день при 50°C.

Таблица 29 Процент различных молекул клонов анти-DLL4 антител, определенный с помощью ЭХ на время 0, и после инкубирования в течение 7 дней и 21 дня при 40°C и 50°C (образцы приготавливали в концентрации 1 мг/мл.)					
Антитело	% мономеров на время 0	% мономеров через 7 дней при 40°C	% мономеров через 7 дней при 50°C	% мономеров через 21 день при 40°C	% мономеров через 21 день при 50°C
E9	99,2	98,6	86,8	90,9	88,1
E9-19	99,3	98,7	96,8	97,4	91,9
E9-71	96,9	96,4	95,4	95,0	91,0
E9-2B	99,0	98,6	97,0	97,1	92,4
E9-1F	98,6	98,2	96,5	96,8	91,9

Антитело	% агрегатов на время 0	% агрегатов через 7 дней при 40°C	% агрегатов через 7 дней при 50°C	% агрегатов через 21 день при 40°C	% агрегатов через 21 день при 50°C
E9	0,3	0,3	0,3	0,5	0,6
E9-19	0,3	0,3	0,4	0,7	1,4
E9-71	2,4	2,3	1,8	2,9	2,8
E9-2B	0,5	0,4	0,5	0,9	1,7
E9-1F	0,3	0,3	0,3	0,6	1,6

Антитело	% фрагментов на время 0	% фрагментов через 7 дней при 40°C	% фрагментов через 7 дней при 50°C	% фрагментов через 21 день при 40°C	% фрагментов через 21 день при 50°C
E9	0,5	1,2	12,9	8,7	11,3
E9-19	0,4	1,0	2,8	1,9	6,7
E9-71	0,7	1,3	2,8	2,1	6,2
E9-2B	0,6	1,0	2,5	2,0	5,9
E9-1F	1,1	1,5	3,2	2,5	6,5

**Пример 9: Оценка фармакокинетических свойств анти-DLL4 антител у грызунов**

Для оценки фармакокинетических свойств анти-DLL4 антител, мышам SCID с врожденным отсутствием природных клеток-киллеров ( $n=3$  на антитело)

- 10 внутрибрюшинно (i.p.) вводили одну дозу антитела в концентрации 5 или 30 мг/кг, в зависимости от перекрестной реактивности антитела с мышевым DLL4. У каждого животного в течение 21 дня непрерывно брали пробы сыворотки (5 мкл цельной крови, разведенной 1:50 в HBS-EP<sup>+</sup>-буфере в определенный момент времени). Концентрации в сыворотке определяли с применением DLL4-специфического метода Biacore. Вкратце, 15 человеческий DLL4 иммунизировали на сенсорном чипе, и образцы впрыскивали через проточную кювету при скорости 5 мкл в минуту в течение 5 минут, а затем измеряли уровни связывания и величины сравнивали со стандартами. Для оценки фармакокинетических параметров:  $C_{max}$  (максимальная концентрация в сыворотке), CL (клиренс) и  $t_{1/2}$  (время полужизни антитела), использовали кривые зависимости 20 концентрации в сыворотке от времени, и полученные данные систематизировали в таблице 30. Что касается антител E9 и A10 PROfusion, то их фармакокинетические свойства были улучшены благодаря конструированию CDR в процессе созревания аффинности.

25 Таблица 30  
Фармакокинетические параметры анти-DLL4 антител у мышей SCID с врожденным отсутствием природных клеток-киллеров

30

35

40

45

Антилого	Доза (мг/кг)	C <sub>max</sub> (мкг/мл)	CL (мл/час/кг)	t <sub>1/2</sub> (дни)
E9	30	201	3.10	1.3
E9-10C	30	165	0.82	5.2
E9-10E	30	263	0.97	3.8
E9-10H	30	235	1.49	3.1
E9-12B	30	146	1.32	3.8
E9-19	30	179	1.08	4.4
E9-1F	30	269	0.89	4.2
E9-2B	30	165	0.65	5.5
E9-5E	30	234	0.95	3.0
E9-66	30	114	2.90	1.9
E9-71	30	102	1.10	4.2
E9-71(L)	30	145	0.83	4.1
E9-71(M)	30	113	1.07	4.3
E9-7E	30	130	1.23	5.8
A10	5	10.5	5.80	3.1
A10.K30	5	15.6	0.69	17.7
A10.K42	5	12.5	0.93	13.8
A10.L45	5	18.6	0.65	13.4

**Пример 10: Обработка анти-DLL4 антителом приводила к увеличению разрастания эндотелиальных клеток *in vitro***

Анализ на разрастание клеток, присутствующих на сферах фибринового геля, проводили для оценки *in vitro* активности клеток HUVEC (пассаж 2-3, Lonza) в отношении аngиогенеза, как описано в литературе (Nakatsu et al., *Microvasc. Res.*, 66: 102-112 (2003)). Вкратце, раствор фибриногена разводили апротинином (4 ед/мл) и тромбином (50 ед/мл). На 3 сферы из цитодекса (Amersham Pharmacia Biotech) наносили 350-400 клеток HUVEC на сферу и оставляли на ночь. Примерно 20 сфер, покрытых HUVEC, заключали в фибриновый сгусток на лунку в 96-луночные планшеты для культивирования тканей. Поверх геля наносили кондиционированную среду, происходящую от нормальных человеческих фибробластов (NHLF, Lonza) при конфлюэнтности 80%. После этого в лунку добавляли анти-DLL4 антитело и контрольное антитело KLH при 15 мкг/мл. На 10 и 12 дни изображения наблюдали с помощью инвертированного микроскопа и ПЗС-камеры Nikon. Ингибирование DLL4 антителами E9 и A10 приводило к усилению разрастания эндотелиальных клеток *in vitro* (данные не приводятся).

**Пример 11: Обработка анти-DLL4 антителом приводила к ингибированию роста опухоли *in vivo***

Влияние анти-DLL4 антител на рост опухоли оценивали на мышах SCID с врожденным отсутствием природных клеток-киллеров, которым подкожно имплантировали опухолевые ксенотрансплантаты Calu-6. Вкратце,  $2 \times 10^6$  клеток подкожно инокулировали в правый задний бок самок мышей SCID с врожденным отсутствием природных клеток-киллеров. Мышей оставляли на 14-18 дней для роста опухолей, после чего измеряли

объем опухоли в данный момент времени электронным штангенциркулем. Размер опухоли вычисляли по формуле:  $L \times W^2 / 2$ . Мышей распределяли по экспериментальным группам ( $n=10$  на группу) так, чтобы каждая группа животных, перед началом проведения терапии, имела эквивалентный средний объем опухоли (обычно в пределах от 180 до 250  $\text{мм}^3$ ). Затем животным внутрибрюшинно вводили дозу анти-DLL4 антител два раза в неделю в течение двух недель (всего 4 дозы). Во время проведения эксперимента объем опухоли измеряли в среднем два раза в неделю до тех пор, пока средний объем опухоли у мышей в каждой группе не достигал  $\geq 2000 \text{ мм}^3$ . Результаты представлены в таблице 31. Антитела PROfusion серии E9, обладающие улучшенными фармакокинетическими свойствами (как показано в примере 9), обнаруживали тенденцию к усилению противоопухолевой активности *in vivo*.

Таблица 31  
Эффективность анти-DLL4 антител у животных с моделью ксенотрансплантата человеческого немелкоклеточного рака легких Calu-6

Обработка	Схема введения доз	% T/C <sup>a</sup>	% ILS <sup>b</sup>
E9	10 мг/кг i.p., 2x/неделя × 2	43**	52**
E9-10C	10 мг/кг i.p., 2x/неделя × 2	26**	81**
E9-2B	10 мг/кг i.p., 2x/неделя × 2	28**	76**
E9-10E	10 мг/кг i.p., 2x/неделя × 2	30**	70**
E9-19	10 мг/кг i.p., 2x/неделя × 2	31**	64**
E9-5E	10 мг/кг i.p., 2x/неделя × 2	30**	57**
E9-71	10 мг/кг i.p., 2x/неделя × 2	34**	63**
E9-1F	10 мг/кг i.p., 2x/неделя × 2	34**	57**
E9-12B	10 мг/кг i.p., 2x/неделя × 2	38**	52**
E9-7E	10 мг/кг i.p., 2x/неделя × 2	38**	44**
E9-10H	10 мг/кг i.p., 2x/неделя × 2	41**	52**
E9-66	10 мг/кг i.p., 2x/неделя × 2	43**	32*

a. %T/C = средний объем опухоли у экспериментальной группы/объем опухоли у контрольной группы × 100. Величины P (показаны звездочками) были получены при сравнении экспериментальной и контрольной групп с применением t-критерия Стьюдента. Измерения проводили на дни 25/26/27.

b. %ILS=(T-C)/C×100, где T = медианное время до конечного измерения в экспериментальной группе, а C = медианное время до конечного измерения в контрольной группе. Величины P (показаны звездочками) были получены при сравнении экспериментальной и контрольной групп с применением log-рангового критерия Каплана-Майера. Конечный объем опухоли составлял 2000  $\text{мм}^3$ .

\*p<0,05; \*\*p<0,01

Содержание всех цитируемых документов (включая литературные источники, патенты, патентные заявки и web-сайты), которые могут упоминаться в настоящей заявке, во всей своей полноте и во всех целях вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

### Эквиваленты

Настоящее изобретение может быть осуществлено и в других конкретных формах, не выходящих за рамки его существа или основных отличительных признаков. Поэтому все вышеуказанные варианты во всех своих аспектах носят иллюстративный характер и не ограничивают настоящее изобретение. Таким образом, объем настоящего изобретения определен в прилагаемой формуле изобретения, а не в вышеприведенном описании, а поэтому все внесенные изменения не должны выходить за рамки значений и серии эквивалентов, определенных в формуле изобретения.

### Формула изобретения

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способные связываться с человеческим DLL4 и содержащие антигенсвязывающий домен, содержащий набор из шести последовательностей областей, определяющих комплементарность (CDR): CDR-

H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где аминокислотная последовательность CDR для

CDR-H1 выбрана из группы, состоящей из:

остатков 31-37 SEQ ID NO: 1;

5 SEQ ID NO: 117;

SEQ ID NO: 121;

SEQ ID NO: 125;

SEQ ID NO: 129;

SEQ ID NO: 133;

10 SEQ ID NO: 137;

SEQ ID NO: 141;

SEQ ID NO: 145;

SEQ ID NO: 149;

SEQ ID NO: 153;

15 SEQ ID NO: 157;

SEQ ID NO: 161;

SEQ ID NO: 165;

SEQ ID NO: 169;

SEQ ID NO: 173;

20 SEQ ID NO: 177;

SEQ ID NO: 181;

SEQ ID NO: 185;

SEQ ID NO: 189;

SEQ ID NO: 193;

25 SEQ ID NO: 197;

SEQ ID NO: 201;

SEQ ID NO: 205;

SEQ ID NO: 209;

SEQ ID NO: 213;

30 остатков 31-37 SEQ ID NO: 334;

остатков 31-37 SEQ ID NO: 336;

остатков 31-37 SEQ ID NO: 338;

остатков 31-37 SEQ ID NO: 340;

остатков 31-37 SEQ ID NO: 342;

35 остатков 31-37 SEQ ID NO: 344;

остатков 31-37 SEQ ID NO: 346;

остатков 31-37 SEQ ID NO: 348;

остатков 31-37 SEQ ID NO: 350;

остатков 31-37 SEQ ID NO: 352;

40 остатков 31-37 SEQ ID NO: 354;

остатков 31-37 SEQ ID NO: 356;

остатков 31-37 SEQ ID NO: 358; и

остатков 31-37 SEQ ID NO: 360;

CDR-H2 выбрана из группы, состоящей из:

45 остатков 52-67 SEQ ID NO: 1;

SEQ ID NO: 118;

SEQ ID NO: 122;

SEQ ID NO: 126;

SEQ ID NO: 130;  
SEQ ID NO: 134;  
SEQ ID NO: 138;  
SEQ ID NO: 142;  
5 SEQ ID NO: 146;  
SEQ ID NO: 150;  
SEQ ID NO: 154;  
SEQ ID NO: 158;  
SEQ ID NO: 162;  
10 SEQ ID NO: 166;  
SEQ ID NO: 170;  
SEQ ID NO: 174;  
SEQ ID NO: 178;  
SEQ ID NO: 182;  
15 SEQ ID NO: 186;  
SEQ ID NO: 190;  
SEQ ID NO: 194;  
SEQ ID NO: 198;  
SEQ ID NO: 202;  
20 SEQ ID NO: 206;  
SEQ ID NO: 210;  
SEQ ID NO: 214;  
остатков 52-67 SEQ ID NO: 334;  
остатков 52-67 SEQ ID NO: 336;  
25 остатков 52-67 SEQ ID NO: 338;  
остатков 52-67 SEQ ID NO: 340;  
остатков 52-67 SEQ ID NO: 342;  
остатков 52-67 SEQ ID NO: 344;  
остатков 52-67 SEQ ID NO: 346;  
30 остатков 52-67 SEQ ID NO: 348;  
остатков 52-67 SEQ ID NO: 350;  
остатков 52-67 SEQ ID NO: 352;  
остатков 52-67 SEQ ID NO: 354;  
остатков 52-67 SEQ ID NO: 356;  
35 остатков 52-67 SEQ ID NO: 358; и  
остатков 52-67 SEQ ID NO: 360;  
CDR-H3 выбрана из группы, состоящей из:  
остатков 100-110 SEQ ID NO: 1;  
SEQ ID NO: 119;  
40 SEQ ID NO: 123;  
SEQ ID NO: 127;  
SEQ ID NO: 131;  
SEQ ID NO: 135;  
SEQ ID NO: 139;  
45 SEQ ID NO: 143;  
SEQ ID NO: 147;  
SEQ ID NO: 151;  
SEQ ID NO: 155;

SEQ ID NO: 159;  
SEQ ID NO: 163;  
SEQ ID NO: 167;  
SEQ ID NO: 171;  
5 SEQ ID NO: 175;  
SEQ ID NO: 179;  
SEQ ID NO: 183;  
SEQ ID NO: 187;  
SEQ ID NO: 191;  
10 SEQ ID NO: 195;  
SEQ ID NO: 199;  
SEQ ID NO: 203;  
SEQ ID NO: 207;  
SEQ ID NO: 211;  
15 SEQ ID NO: 215;  
остатков 100-110 SEQ ID NO: 334;  
остатков 100-110 SEQ ID NO: 336;  
остатков 100-110 SEQ ID NO: 338;  
остатков 100-110 SEQ ID NO: 340;  
20 остатков 100-110 SEQ ID NO: 342;  
остатков 100-110 SEQ ID NO: 344;  
остатков 100-110 SEQ ID NO: 346;  
остатков 100-110 SEQ ID NO: 348;  
остатков 100-110 SEQ ID NO: 350;  
25 остатков 100-110 SEQ ID NO: 352;  
остатков 100-110 SEQ ID NO: 354;  
остатков 100-110 SEQ ID NO: 356;  
остатков 100-110 SEQ ID NO: 358; и  
остатков 100-110 SEQ ID NO: 360;  
30 CDR-L1 выбрана из группы, состоящей из:  
остатков 23-33 SEQ ID NO: 111;  
SEQ ID NO: 217;  
SEQ ID NO: 221;  
SEQ ID NO: 225;  
35 SEQ ID NO: 229;  
SEQ ID NO: 233;  
SEQ ID NO: 237;  
SEQ ID NO: 241;  
SEQ ID NO: 245;  
40 SEQ ID NO: 249;  
SEQ ID NO: 253;  
SEQ ID NO: 257;  
SEQ ID NO: 261;  
SEQ ID NO: 265;  
45 SEQ ID NO: 269;  
SEQ ID NO: 273;  
SEQ ID NO: 277;  
SEQ ID NO: 281;

SEQ ID NO: 285;  
SEQ ID NO: 289;  
SEQ ID NO: 293;  
SEQ ID NO: 297;  
5 SEQ ID NO: 301;  
SEQ ID NO: 305;  
SEQ ID NO: 309;  
SEQ ID NO: 313;  
остатков 23-33 SEQ ID NO: 335;  
10 остатков 23-33 SEQ ID NO: 337;  
остатков 23-33 SEQ ID NO: 339;  
остатков 23-33 SEQ ID NO: 341;  
остатков 23-33 SEQ ID NO: 343;  
остатков 24-34 SEQ ID NO: 345;  
15 остатков 23-33 SEQ ID NO: 347;  
остатков 24-34 SEQ ID NO: 349;  
остатков 24-34 SEQ ID NO: 351;  
остатков 24-34 SEQ ID NO: 353;  
остатков 24-34 SEQ ID NO: 355;  
20 остатков 23-33 SEQ ID NO: 357;  
остатков 23-33 SEQ ID NO: 359; и  
остатков 23-33 SEQ ID NO: 361;  
CDR-L2 выбрана из группы, состоящей из:  
остатков 49-55 SEQ ID NO: 111;  
25 SEQ ID NO: 230;  
SEQ ID NO: 234;  
SEQ ID NO: 238;  
SEQ ID NO: 242;  
SEQ ID NO: 246;  
30 SEQ ID NO: 250;  
SEQ ID NO: 254;  
SEQ ID NO: 258;  
SEQ ID NO: 262;  
SEQ ID NO: 266;  
35 SEQ ID NO: 270;  
SEQ ID NO: 218;  
SEQ ID NO: 222;  
SEQ ID NO: 226;  
SEQ ID NO: 274;  
40 SEQ ID NO: 278;  
SEQ ID NO: 302;  
SEQ ID NO: 294;  
SEQ ID NO: 282;  
SEQ ID NO: 290;  
45 SEQ ID NO: 298;  
SEQ ID NO: 286;  
SEQ ID NO: 306;  
SEQ ID NO: 310;

SEQ ID NO: 314;  
остатков 49-55 SEQ ID NO: 335;  
остатков 49-55 SEQ ID NO: 337;  
остатков 49-55 SEQ ID NO: 339;  
5 остатков 49-55 SEQ ID NO: 341;  
остатков 49-55 SEQ ID NO: 343;  
остатков 50-56 SEQ ID NO: 345;  
остатков 49-55 SEQ ID NO: 347;  
остатков 50-56 SEQ ID NO: 349;  
10 остатков 50-56 SEQ ID NO: 351;  
остатков 50-56 SEQ ID NO: 353;  
остатков 50-56 SEQ ID NO: 355;  
остатков 49-55 SEQ ID NO: 357;  
остатков 49-55 SEQ ID NO: 359; и  
15 остатков 49-55 SEQ ID NO: 361;  
и  
CDR-L3 выбрана из группы, состоящей из:  
остатков 88-96 SEQ ID NO: 111;  
SEQ ID NO: 231;  
20 SEQ ID NO: 235;  
SEQ ID NO: 239;  
SEQ ID NO: 243;  
SEQ ID NO: 247;  
SEQ ID NO: 251;  
25 SEQ ID NO: 255;  
SEQ ID NO: 259;  
SEQ ID NO: 263;  
SEQ ID NO: 267;  
SEQ ID NO: 271;  
30 SEQ ID NO: 219;  
SEQ ID NO: 223;  
SEQ ID NO: 227;  
SEQ ID NO: 275;  
SEQ ID NO: 279;  
35 SEQ ID NO: 303;  
SEQ ID NO: 295;  
SEQ ID NO: 283;  
SEQ ID NO: 291;  
SEQ ID NO: 299;  
40 SEQ ID NO: 287;  
SEQ ID NO: 307;  
SEQ ID NO: 311;  
SEQ ID NO: 315;  
остатков 88-96 SEQ ID NO: 335;  
45 остатков 88-96 SEQ ID NO: 337;  
остатков 88-96 SEQ ID NO: 339;  
остатков 88-96 SEQ ID NO: 341;  
остатков 88-96 SEQ ID NO: 343;

- остатков 89-97 SEQ ID NO: 345;  
 остатков 88-96 SEQ ID NO: 347;  
 остатков 89-97 SEQ ID NO: 349;  
 остатков 89-97 SEQ ID NO: 351;  
<sup>5</sup> остатков 89-97 SEQ ID NO: 353;  
 остатков 89-97 SEQ ID NO: 355;  
 остатков 88-96 SEQ ID NO: 357;  
 остатков 88-96 SEQ ID NO: 359; и  
 остатков 88-96 SEQ ID NO: 361.
- <sup>10</sup> 2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат набор CDR из 3 CDR, выбранных из группы наборов CDR вариабельного домена, состоящих из:
- Набора VH E9 CDR  
 CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 1  
<sup>15</sup> CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 1 и  
 CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 1
- Набора VL E9 CDR  
 CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 111  
 CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 111 и  
<sup>20</sup> CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 111
- Набора VH E9.4 CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 117  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 118 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 119
- <sup>25</sup> Набора VL E9.4 CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 229  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 230 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 231
- Набора VH E9.11 CDR  
<sup>30</sup> CDR-H1: SEQ ID NO: 121  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 122 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 123
- Набора VL E9.11 CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 233  
<sup>35</sup> CDR-L2: SEQ ID NO: 234 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 235
- Набора VH E9.14 CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 125  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 126 и  
<sup>40</sup> CDR-H3: SEQ ID NO: 127
- Набора VL E9.14 CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 237  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 238 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 239
- <sup>45</sup> Набора VH E9.17 CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 129  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 130 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 131

- Набора VL E9.17 CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 241  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 242 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 243
- Набора VH E9.18 CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 133  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 134 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 135
- Набора VL E9.18 CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 245  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 246 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 247
- Набора VH E9.19 CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 137  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 138 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 139
- Набора VL E9.19 CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 249  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 250 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 251
- Набора VH E9.22 CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 141  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 142 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 143
- Набора VL E9.22 CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 253  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 254 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 255
- Набора VH E9.48 CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 145  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 146 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 147
- Набора VL E9.48 CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 257  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 258 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 259
- Набора VH E9.65 CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 149  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 150 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 151
- Набора VL E9.65 CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 261  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 262 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 263
- Набора VH E9.66 CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 153  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 154 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 155

- Набора VL E9.66 CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 265  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 266 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 267
- Набора VH E9.71 CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 157  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 158 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 159
- Набора VL E9.71 CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 269  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 270 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 271
- Набора VH E9.13 CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 161  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 162 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 163
- Набора VL E9.13 CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 217  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 218 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 219
- Набора VH E9.16 CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 165  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 166 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 167
- Набора VL E9.16 CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 221  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 222 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 223
- Набора VH E9.38 CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 169  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 170 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 171
- Набора VL E9.38 CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 225  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 226 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 227
- Набора VH E9.2B CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 173  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 174 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 175
- Набора VL E9.2B CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 273  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 274 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 275
- Набора VH E9.1F CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 177  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 178 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 179

- Набора VL E9.1F CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 277  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 278 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 279
- Набора VH E9.10H CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 181  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 182 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 183
- Набора VL E9.10H CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 301  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 302 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 303
- Набора VH E9.5E CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 185  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 186 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 187
- Набора VL E9.5E CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 293  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 294 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 295
- Набора VH E9.10C CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 189  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 190 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 191
- Набора VL E9.10C CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 281  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 282 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 283
- Набора VH E9.7E CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 193  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 194 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 195
- Набора VL E9.7E CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 289  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 290 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 291
- Набора VH E9.12B CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 197  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 198 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 199
- Набора VL E9.12B CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 297  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 298 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 299
- Набора VH E9.10E CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 201  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 202 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 203

- Набора VL E9.10E CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 285  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 286 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 287
- Набора VH E9.6A CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 205  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 206 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 207
- Набора VL E9.6A CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 305  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 306 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 307
- Набора VH E9.7A CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 209  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 210 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 211
- Набора VL E9.7A CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 309  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 310 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 311
- Набора VH E9.8H CDR  
 CDR-H1: SEQ ID NO: 213  
 CDR-H2: SEQ ID NO: 214 и  
 CDR-H3: SEQ ID NO: 215
- Набора VL E9.8H CDR  
 CDR-L1: SEQ ID NO: 313  
 CDR-L2: SEQ ID NO: 314 и  
 CDR-L3: SEQ ID NO: 315
- Набора VH E9.1 CDR  
 CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 334  
 CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 334 и  
 CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 334
- Набора VL E9.1 CDR  
 CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 335  
 CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 335 и  
 CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 335
- Набора VH E9-SE1 CDR  
 CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 336  
 CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 336 и  
 CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 336
- Набора VL E9-SE1 CDR  
 CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 337  
 CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 337 и  
 CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 337
- Набора VH E9-SE2 CDR  
 CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 338  
 CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 338 и  
 CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 338

Набора VL E9-SE2 CDR

CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 339  
 CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 339 и  
 CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 339

5 Набора VH E9-SE3 CDR

CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 340  
 CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 340 и  
 CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 340

Набора VL E9-SE3 CDR

*10* CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 341  
 CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 341 и  
 CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 341

Набора VH E9-SE4 CDR

CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 342  
*15* CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 342 и  
 CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 342

Набора VL E9-SE4 CDR

CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 343  
 CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 343 и  
*20* CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 343

Набора VH E9-SE5 CDR

CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 344  
 CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 344 и  
 CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 344

25 Набора VL E9-SE5 CDR

CDR-L1: остатки 24-34 SEQ ID NO: 345  
 CDR-L2: остатки 50-56 SEQ ID NO: 345 и  
 CDR-L3: остатки 89-97 SEQ ID NO: 345

Набора VH E9-SE6 CDR

*30* CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 346  
 CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 346 и  
 CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 346

Набора VL E9-SE6 CDR

CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 347  
*35* CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 347 и  
 CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 347

Набора VH E9-SE7 CDR

CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 348  
 CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 348 и  
*40* CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 348

Набора VL E9-SE7 CDR

CDR-L1: остатки 24-34 SEQ ID NO: 349  
 CDR-L2: остатки 50-56 SEQ ID NO: 349 и  
 CDR-L3: остатки 89-97 SEQ ID NO: 349

45 Набора VH E9-SE8 CDR

CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 350  
 CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 350 и  
 CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 350

Набора VL E9-SE8 CDR

CDR-L1: остатки 24-34 SEQ ID NO: 351  
 CDR-L2: остатки 50-56 SEQ ID NO: 351 и  
 CDR-L3: остатки 89-97 SEQ ID NO: 351

5 Набора VH E9-FR1 CDR

CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 352  
 CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 352 и  
 CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 352

Набора VL E9-FR1 CDR

*10* CDR-L1: остатки 24-34 SEQ ID NO: 353  
 CDR-L2: остатки 50-56 SEQ ID NO: 353 и  
 CDR-L3: остатки 89-97 SEQ ID NO: 353

Набора VH E9-FR2 CDR

CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 354  
*15* CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 354 и  
 CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 354

Набора VL E9-FR2 CDR

CDR-L1: остатки 24-34 SEQ ID NO: 355  
 CDR-L2: остатки 50-56 SEQ ID NO: 355 и  
*20* CDR-L3: остатки 89-97 SEQ ID NO: 355

Набора VH E9.71 CDR

CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 356  
 CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 356 и  
 CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 356

25 Набора VL E9.71 CDR

CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 357  
 CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 357 и  
 CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 357

Набора VH E9.71(M) CDR

*30* CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 358  
 CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 358 и  
 CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 358

Набора VL E9.71(M) CDR

CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 359  
*35* CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 359 и  
 CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 359

Набора VH E9.71(L) CDR

CDR-H1: остатки 31-37 SEQ ID NO: 360  
 CDR-H2: остатки 52-67 SEQ ID NO: 360 и  
*40* CDR-H3: остатки 100-110 SEQ ID NO: 360

Набора VL E9.71(L) CDR

CDR-L1: остатки 23-33 SEQ ID NO: 361  
 CDR-L2: остатки 49-55 SEQ ID NO: 361 и  
 CDR-L3: остатки 88-96 SEQ ID NO: 361.

*45* 3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.2, содержащий два набора CDR вариабельных доменов.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.3, где указанные два набора CDR вариабельных доменов выбраны из группы, состоящей из:

- набора VH E9 CDR и набора VL E9 CDR,  
набора VH E9.4 CDR и набора VL E9.4 CDR,  
набора VH E9.11 CDR и набора VL E9.11 CDR,  
набора VH E9.14 CDR и набора VL E9.14 CDR,  
5 набора VH E9.17 CDR и набора VL E9.17 CDR,  
набора VH E9.18 CDR и набора VL E9.18 CDR,  
набора VH E9.19 CDR и набора VL E9.19 CDR,  
набора VH E9.22 CDR и набора VL E9.22 CDR,  
набора VH E9.48 CDR и набора VL E9.48 CDR,  
10 набора VH E9.65 CDR и набора VL E9.65 CDR,  
набора VH E9.66 CDR и набора VL E9.66 CDR,  
набора VH E9.71 CDR и набора VL E9.71 CDR,  
набора VH E9.13 CDR и набора VL E9.13 CDR,  
набора VH E9.16 CDR и набора VL E9.16 CDR,  
15 набора VH E9.38 CDR и набора VL E9.38 CDR,  
набора VH E9.2B CDR и набора VL E9.2B CDR,  
набора VH E9.1F CDR и набора VL E9.1F CDR,  
набора VH E9.10H CDR и набора VL E9.10H CDR,  
набора VH E9.5E CDR и набора VL E9.5E CDR,  
20 набора VH E9.10C CDR и набора VL E9.10C CDR,  
набора VH E9.7E CDR и набора VL E9.7E CDR,  
набора VH E9.12B CDR и набора VL E9.12B CDR,  
набора VH E9.10E CDR и набора VL E9.10E CDR,  
набора VH E9.6A CDR и набора VL E9.6A CDR,  
25 набора VH E9.7A CDR и набора VL E9.7A CDR,  
набора VH E9.8H CDR и набора VL E9.8H CDR,  
набора VH E9-SE1 CDR и набора VL E9-SE1 CDR,  
набора VH E9-SE2 CDR и набора VL E9-SE2 CDR,  
набора VH E9-SE3 CDR и набора VL E9-SE3 CDR,  
30 набора VH E9-SE4 CDR и набора VL E9-SE4 CDR,  
набора VH E9-SE5 CDR и набора VL E9-SE5 CDR,  
набора VH E9-SE6 CDR и набора VL E9-SE6 CDR,  
набора VH E9-SE7 CDR и набора VL E9-SE7 CDR,  
набора VH E9-SE8 CDR и набора VL E9-SE8 CDR,  
35 набора VH E9-FR1 CDR и набора VL E9-FR1 CDR,  
набора VH E9-FR2 CDR и набора VL E9-FR2 CDR,  
набора VH E9.71 CDR и набора VL E9.71 CDR,  
набора VH E9.71(M) CDR и набора VL E9.71(M) CDR, и  
набора VH E9.71(L) CDR и набора VL E9.71(L) CDR.
- 40 5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по пп.1-4, который также содержит человеческую акцепторную каркасную область.
6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.5, где указанная человеческая акцепторная каркасная область содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:
- 45 SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID

NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 и SEQ ID NO: 98.

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где указанное антитело или

антигенсвязывающий фрагмент содержат по меньшей мере одну аминокислотную последовательность вариабельного домена, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 111, 116, 228, 120, 232, 124, 236, 128, 240, 132, 244, 136, 248, 140, 252, 144, 256, 148, 260, 152, 264, 156, 268, 160, 216, 164, 220, 168, 224, 172, 272, 176, 276, 180, 300, 184, 292, 188, 280, 192, 288, 196, 296, 200, 284, 204, 304, 208, 308, 212, 312, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360 и 361.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат два вариабельных домена, где указанные два вариабельных домена имеют аминокислотные последовательности, выбранные из

группы, состоящей из:

- a) SEQ ID NO: 1 и 111,
- b) SEQ ID NO: 116 и 228,
- c) SEQ ID NO: 120 и 232,
- d) SEQ ID NO: 124 и 236,
- e) SEQ ID NO: 128 и 240,
- f) SEQ ID NO: 132 и 244,
- g) SEQ ID NO: 136 и 248,
- h) SEQ ID NO: 140 и 252,
- i) SEQ ID NO: 144 и 256,
- j) SEQ ID NO: 148 и 260,
- k) SEQ ID NO: 152 и 264,
- l) SEQ ID NO: 156 и 268,
- m) SEQ ID NO: 160 и 216,
- n) SEQ ID NO: 164 и 220,
- o) SEQ ID NO: 168 и 224,
- p) SEQ ID NO: 172 и 272,
- q) SEQ ID NO: 176 и 276,
- r) SEQ ID NO: 180 и 300,
- s) SEQ ID NO: 184 и 292,
- t) SEQ ID NO: 188 и 280,
- u) SEQ ID NO: 192 и 288,
- v) SEQ ID NO: 196 и 296,
- w) SEQ ID NO: 200 и 284,

- x) SEQ ID NO: 204 и 304,
- y) SEQ ID NO: 208 и 308,
- z) SEQ ID NO: 212 и 312,
- aa) SEQ ID NO: 334 и 335,
- 5 bb) SEQ ID NO: 336 и 337,
- cc) SEQ ID NO: 338 и 339,
- dd) SEQ ID NO: 340 и 341,
- ee) SEQ ID NO: 342 и 343,
- ff) SEQ ID NO: 344 и 345,
- 10 gg) SEQ ID NO: 346 и 347,
- hh) SEQ ID NO: 348 и 349,
- ii) SEQ ID NO: 350 и 351,
- jj) SEQ ID NO: 352 и 353,
- kk) SEQ ID NO: 354 и 355,
- 15 ll) SEQ ID NO: 358 и 359, и
- mm) SEQ ID NO: 360 и 361.

9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.8, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат по меньшей мере два вариабельных домена, где по меньшей мере два указанных вариабельных домена имеют аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

- a) SEQ ID NO: 1 и 111,
- b) SEQ ID NO: 116 и 228,
- c) SEQ ID NO: 120 и 232,
- d) SEQ ID NO: 124 и 236,
- 25 e) SEQ ID NO: 128 и 240,
- f) SEQ ID NO: 132 и 244,
- g) SEQ ID NO: 136 и 248,
- h) SEQ ID NO: 144 и 256,
- i) SEQ ID NO: 148 и 260,
- 30 j) SEQ ID NO: 152 и 264,
- k) SEQ ID NO: 156 и 268,
- l) SEQ ID NO: 334 и 335,
- m) SEQ ID NO: 336 и 337,
- n) SEQ ID NO: 338 и 339,
- 35 o) SEQ ID NO: 340 и 341,
- p) SEQ ID NO: 342 и 343,
- q) SEQ ID NO: 344 и 345,
- gg) SEQ ID NO: 346 и 347,
- hh) SEQ ID NO: 348 и 349,
- 40 ii) SEQ ID NO: 350 и 351,
- jj) SEQ ID NO: 352 и 353,
- kk) SEQ ID NO: 354 и 355,
- ll) SEQ ID NO: 358 и 359, и
- mm) SEQ ID NO: 360 и 361.

45 10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.8, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат по меньшей мере два вариабельных домена, где по меньшей мере два указанных вариабельных домена имеют аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

- a) SEQ ID NO: 268 и SEQ ID NO: 156;
- b) SEQ ID NO: 280 и SEQ ID NO: 188;
- c) SEQ ID NO: 272 и SEQ ID NO: 172;
- d) SEQ ID NO: 284 и SEQ ID NO: 200;
- 5 e) SEQ ID NO: 248 и SEQ ID NO: 136;
- f) SEQ ID NO: 292 и SEQ ID NO: 184; и
- g) SEQ ID NO: 276 и SEQ ID NO: 176.

11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, который также содержит константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, выбранный из группы, состоящей из константного домена человеческого IgM, константного домена человеческого IgG1, константного домена человеческого IgG2, константного домена человеческого IgG3, константного домена человеческого IgG4, константного домена человеческого IgE и константного домена человеческого IgA.

12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.11, где указанный константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой константный домен человеческого IgG1, при этом указанный константный домен человеческого IgG1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3.

13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, дополнительно содержащий константный домен легкой цепи иммуноглобулина, где указанный константный домен легкой цепи иммуноглобулина представляет собой константный домен Ig каппа человека, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, дополнительно содержащий константный домен легкой цепи иммуноглобулина, где указанный константный домен легкой цепи иммуноглобулина представляет собой константный домен Ig лямбда человека, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 268.

16. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 359.

35 17. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 360, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 361.

18. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 248.

19. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.15-18, содержащий константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, и константный домен легкой цепи иммуноглобулина, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

20. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.15-18, дополнительно содержащий сигнальный пептид легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 365.

21. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где указанные антитело

или антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из молекулы иммуноглобулина, scFv, моноклонального антитела, человеческого антитела, химерного антитела, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, Fv-фрагмента, Fv, связанного дисульфидной связью, диатела, мультиспецифического антитела, биспецифического антитела, связывающего белка иммуноглобулина с двумя вариабельными доменами (DVD-Ig) и антитела с двойной специфичностью.

22. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.21, где указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой человеческое антитело или связывающий белок иммуноглобулин с двумя вариабельными доменами (DVD-Ig).

23. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, обладающий способностью

связываться с человеческим DLL-4, где указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат:

константную область тяжелой цепи Ig, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3;

константную область легкой цепи Ig, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5;

вариабельную область тяжелой цепи Ig, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 1, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172,

25 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358 и 360; и

вариабельную область легкой цепи Ig, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 111, 228, 232, 236, 240, 244, 248, 252, 256, 260, 264, 268, 216, 220, 224, 272,

30 276, 300, 292, 280, 288, 296, 284, 304, 308, 312, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 353, 355, 357, 359 и 361.

24. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.23, где указанной константной областью легкой цепи Ig является SEQ ID NO: 5.

25. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где указанные антитело

или антигенсвязывающий фрагмент обладают способностью модулировать биологическую функцию DLL4.

26. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент обладают способностью нейтрализовать DLL4.

27. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.26, где указанный DLL4 выбран из группы, состоящей из человеческого DLL4, мышиного DLL4, DLL4 яванского макака и крысиного DLL4.

28. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.25, где указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент обладают способностью снижать нормальный ангиогенез.

45 29. Меченое антитело или антигенсвязывающий фрагмент для модуляции DLL4-ассоциированных состояний, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.21, где указанные антитело или антигенсвязывающие фрагменты конъюгированы с детектируемой меткой и где меченое антитело или антигенсвязывающий фрагмент

связываются с человеческим DLL4.

30. Конструкция антитела или антигенсвязывающего фрагмента для модуляции DLL4-ассоциированных состояний, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, а также константный домен иммуноглобулина, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент сохраняет способность связывать человеческий DLL4.

31. Конструкция антитела или антигенсвязывающего фрагмента по п.30, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент выбирают из группы, состоящей из:

молекул иммуноглобулина,

моноклонального антитела,

химерного антитела,

CDR-привитого антитела,

Fab,

Fab',

F(ab')<sub>2</sub>,

Fv,

Fv, связанного дисульфидной связью,

scFv,

диатела,

мультиспецифического антитела,

антитела с двойной специфичностью,

связывающего белка иммуноглобулина с двумя вариабельными доменами (DVD-

Ig) и

биспецифического антитела.

32. Конструкция антитела или антигенсвязывающего домена по п.30, где указанная

конструкция антитела или антигенсвязывающего домена включает константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, выбранный из группы, состоящей из:

константного домена человеческого IgM,

константного домена человеческого IgG1,

константного домена человеческого IgG2,

константного домена человеческого IgG3,

константного домена человеческого IgG4,

константного домена человеческого IgE,

константного домена человеческого IgA, и

варианта константного домена IgG с одной или несколькими мутациями,

изменяющими силу связывания с неонатальным Fc-рецептором, рецепторами Fc-гамма или C1q.

33. Конъюгат антитела или антигенсвязывающего фрагмента для модуляции DLL4-ассоциированных состояний, содержащий конструкцию антитела или

антигенсвязывающего фрагмента по п.30, где указанная конструкция антитела или

антигенсвязывающего фрагмента конъюгирована с терапевтическим или цитотоксическим средством и где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связываются с человеческим DLL4.

34. Конъюгат антитела или антигенсвязывающего фрагмента по п.33, где указанное терапевтическое или цитотоксическое средство выбрано из группы, состоящей из

антиметаболита, алкилирующего агента, антибиотика, фактора роста, цитокина, антиангиогенного агента, антимитотического средства, антрациклина, токсина и апоптотического агента.

35. Изолированная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4.

36. Вектор экспрессии, содержащий изолированную нуклеиновую кислоту по п.35.

37. Клетка-хозяин для экспрессии антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащая вектор экспрессии по п.36.

5 38. Клетка-хозяин по п.37, где указанная клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, выбранную из группы, состоящей из клетки протиста, клетки животного, клетки растения и клетки грибов.

10 39. Клетка-хозяин по п.38, где указанной эукариотической клеткой является клетка животного, выбранная из группы, состоящей из клетки млекопитающего, клетки птиц и клетки насекомого.

40. Клетка-хозяин по п.38, где указанной клеткой-хозяином является клетка CHO, клетка COS, клетка Sf9 или дрожжевая клетка.

15 41. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с человеческим DLL4, где указанный способ включает культивирование клетки-хозяина по п.37 в культуральной среде в условиях, достаточных для 15 продуцирования антитела или антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с человеческим DLL4.

20 42. Кристаллизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий антитело или его связывающий фрагмент по п.1, где антитело или его связывающий фрагмент присутствуют в виде кристалла.

43. Фармацевтическая композиция для модуляции заболевания или расстройства, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4 в эффективном количестве и фармацевтически приемлемый носитель.

25 44. Фармацевтическая композиция по п.43, дополнительно содержащая по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство для лечения расстройства, ассоцииированного с негативной активностью DLL4.

30 45. Фармацевтическая композиция по п.44, где указанное дополнительное средство выбрано из группы, состоящей из ингибиторов ангиогенеза; ингибиторов киназы; блокаторов костимулирующей молекулы; блокаторов адгезивной молекулы; антитела против цитокина или его функционального фрагмента; метотрексата; кортикостероидов; циклоспорина; рапамицина; FK506 и нестероидных противовоспалительных средств.

46. Способ снижения активности человеческого DLL4, включающий контактирование человеческого DLL4 с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-4, которое приводит к снижению DLL4-активности.

35 47. Способ снижения активности человеческого DLL4 у человека, страдающего расстройством, ассоциированным с негативной активностью DLL4, где указанный способ включает введение указанному индивидууму антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-4, которое приводит к снижению активности DLL4 у человека.

40 48. Фармацевтическая композиция по п.43, где указанное заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из рака молочной железы, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легких, рака ротовоглотки, рака гортани, рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака печени, рака желчного пузыря, рака желчных протоков, рака тонкого кишечника, рака мочевых путей, рака женских половых органов, рака мужских половых органов, рака эндокринных желез, рака кожи, гемангиомы, меланомы, саркомы, опухоли головного мозга, рака нервных тканей, рака глаз, рака мозговой оболочки, солидных опухолей, происходящих от гемопоэтических злокачественных опухолей, метастазов опухолей, глазной

неоваскуляризации, отеков, ревматоидного артрита, рассеянного склероза, атеросклеротических бляшек, болезни Крона, воспалительного заболевания кишечника, асцита, трудно поддающегося лечению, псориаза, саркоидоза, артериосклероза, сепсиса, пептических язв, ожогов, панкреатита, поликистоза яичника (ПКЯ), эндометриоза,

- 5 фибромы матки, злокачественной гипертрофии предстательной железы и других ассоциированных и не ассоциированных с ангиогенезом заболеваний, характеризующихся абберантной активностью DLL4.

49. Способ лечения пациента, страдающего расстройством, ассоциированным с негативным воздействием DLL4, где указанный способ включает стадию введения 10 антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-4 до, во время или после введения второго агента, где указанный второй агент выбран из группы, состоящей из антитела или его фрагмента, обладающего способностью связываться с человеческим VEGFR2; метотрексата, антитела или его фрагмента, обладающего способностью связываться с человеческим TNF; кортикоステроидов; циклоспорина; 15 рапамицина; FK506 и нестероидных противовоспалительных средств.

20

25

30

35

40

45

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Abbott Laboratories, Inc.  
 Morgan-Lappe, Susan E

<120> ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ DLL4-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ

<130> 10289.WO.O1

<150> US 61/238,152  
 <151> 2009-08-29

<150> US 61/261,728  
 <151> 2009-11-16

<160> 377

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 2  
 <211> 330  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 3

<211> 330

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мутантная константная область IgG1

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

## RU 2570639 C2

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 4  
 <211> 106  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

<210> 5  
 <211> 105  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
 20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val  
 35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
 50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
 65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
 85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 100 105

<210> 6  
 <211> 30  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR1 VH2-70/JH6

&lt;400&gt; 6

Glu	Val	Thr	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Gln
1					5						10			15	

Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	
					20				25			30		

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR2 VH2-70/JH6

&lt;400&gt; 7

Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	
1					5					10				

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR3 VH2-70/JH6

&lt;400&gt; 8

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1					5				10					15	

Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
								20		25			30		

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR4 VH2-70/JH6

&lt;400&gt; 9

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
1					5				10					

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR1 VH2-26/JH6

&lt;400&gt; 10

Glu	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Val	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Glu
1				5					10				15		

Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser		
				20				25				30			

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR3 VH2-26/JH6

&lt;400&gt; 11

Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Val	Leu	Thr
1				5					10				15		

Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
						20			25				30		

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR1 VH3-72/JH6

&lt;400&gt; 12

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10				15	

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	
						20		25				30		

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR2 VH3-72/JH6/JH6

&lt;400&gt; 13

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Gly
1				5					10				

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR3 VH3-72/JH6/JH6

&lt;400&gt; 14

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln
1									10						15

Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
									25					30	

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR1 VH3-21/JH6

&lt;400&gt; 15

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1					5					10				15	

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	
						20		25					30	

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR2 VH3-21/JH6

&lt;400&gt; 16

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser
1					5				10				

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR3 VH3-21/JH6

&lt;400&gt; 17

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln
1									10						15

Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
									25					30	

<210> 18  
<211> 30  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR1 VH1-69/JH6  
<400> 18

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser  
20 25 30

<210> 19  
<211> 14  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR2 VH1-69/JH6  
<400> 19

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly  
1 5 10

<210> 20  
<211> 32  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR3 VH1-69/JH6  
<400> 20

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
20 25 30

<210> 21  
<211> 30  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR1 VH1-18/JH6  
<400> 21

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 20 25 30

<210> 22

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR3 VH1-18/JH6

<400> 22

Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
 1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 23

<211> 23

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR1 B3/JK4

<400> 23

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys  
 20

<210> 24

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR2 B3/JK4

<400> 24

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 25

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR3 B3/JK4

<400> 25

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

<210> 26  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR4 B3/JK4

<400> 26

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10

<210> 27  
 <211> 23  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR1 L2/JK4

<400> 27

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
 20

<210> 28  
 <211> 15  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR2 L2/JK4

<400> 28

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 29  
 <211> 32  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR3 L2/JK4

<400> 29

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 30  
 <211> 23  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR1 L15/JK4  
 <400> 30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

<210> 31  
 <211> 15  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR2 L15/JK4  
 <400> 31

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 32  
 <211> 32  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR3 L15/JK4  
 <400> 32

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 33  
 <211> 23  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR1 L5/JK4

<400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
20

<210> 34

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR2 L5/JK4

<400> 34

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 35

<211> 30

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR1 IGHV4-59

<400> 35

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser  
20 25 30

<210> 36

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR2 IGHV4-59

<400> 36

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
1 5 10

<210> 37

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR3 IGHV4-59

<400> 37

Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys
1					5				10					15	

Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 38

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR4 IGHV4-59/JH

<400> 38

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5				10		

<210> 39

<211> 30

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FW1 IGHV3-66

<400> 39

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10				15			

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	
								20		25		30		

<210> 40

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FW2 IGHV3-66

<400> 40

Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly
1					5				10				

<210> 41

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FW3 IGHV3-66

<400> 41

Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Ser	Phe	Tyr	Leu	Gln
1					5				10					15	

Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 42

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FW4 IGHV3-66/JH

<400> 42

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5				10		

<210> 43

<211> 30

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR1 IGHV4-59

<400> 43

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Glu
1				5				10				15			

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser
	20					25					30		

<210> 44

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR2 IGHV4-59

<400> 44

Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly
1				5					10				

<210> 45

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR3 IGHV4-59

<400> 45

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Tyr Leu Lys  
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 46

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR4 IGHV4-59/JH

<400> 46

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 47

<211> 30

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR1 IGHV5-51

<400> 47

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Thr Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser  
 20 25 30

<210> 48

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR2 IGHV5-51

<400> 48

Trp Ile Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10

<210> 49

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR3 IGHV5-51

<400> 49

Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Phe Asn Thr Phe Phe Leu Gln  
1 5 10 15

Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg  
20 25 30

<210> 50

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR4 IGHV5-51/JH

<400> 50

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 51

<211> 30

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR1 IGHV2-70

<400> 51

Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser  
20 25 30

<210> 52

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR2 IGHV2-70

<400> 52

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
1 5 10

<210> 53

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR3 IGHV2-70

<400> 53

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Val Leu Thr  
 1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 54

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR4 IGHV2-70/JH

<400> 54

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 55

<211> 30

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR1 IGHV3-15

<400> 55

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Ser Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg  
 20 25 30

<210> 56

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR2 IGHV3-15

<400> 56

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala  
 1 5 10

<210> 57

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR3 IGHV3-15

<400> 57

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys  
20 25 30

<210> 58

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR4 IGHV3-15/JH

<400> 58

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 59

<211> 30

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR1 IGHV3-43

<400> 59

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly  
20 25 30

<210> 60

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR2 IGHV3-43

<400> 60

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala  
1 5 10

<210> 61

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR3 IGHV3-43

<400> 61

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln
1															15
5															

Leu	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys
															30
20															
25															

<210> 62

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность тяжелой цепи FR4 IGHV3-43/JH

<400> 62

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1										
5										
10										

<210> 63

<211> 22

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR1 IGLV3-1

<400> 63

Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln
1															15
5															
10															

Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys
20					

<210> 64

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR2 IGLV3-1

<400> 64

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
1														
5														
10														

<210> 65

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR3 IGLV3-1

<400> 65

Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr
1					5									10	

Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Pro	Met	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys
					20								30		

<210> 66

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR4 IGLV3-1/JL

<400> 66

Phe	Gly	Tyr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu
1					5				10

<210> 67

<211> 22

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR1 IGLV3-1

<400> 67

Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln
1					5								10		15

Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys
			20		

<210> 68

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR2 IGLV3-1

<400> 68

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
1					5								10	

15

<210> 69

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR3 IGLV3-1

<400> 69

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 70

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR4 IGLV3-1/JL

<400> 70

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
1 5 10

<210> 71

<211> 21

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR1 IGLV3-1

<400> 71

Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr  
1 5 10 15

Ala Ser Ile Thr Cys  
20

<210> 72

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR2 IGLV3-1

<400> 72

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 73

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR3 IGLV3-1

<400> 73

Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr
1					5									10	

Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Pro	Met	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys
					20			25							30

<210> 74

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR4 IGLV3-1/JL

<400> 74

Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly
1				5				10	

<210> 75

<211> 22

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR1 IGLV3-1

<400> 75

Leu	Tyr	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln
1				5					10				15		

Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys
		20			

<210> 76

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR2 IGLV3-1

<400> 76

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
1					5				10				15	

<210> 77

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR3 IGLV3-1

<400> 77

Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr
1					5									10	

Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Thr	Met	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Leu	Cys
						20								30	

<210> 78

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR4 IGLV3-1/JL

<400> 78

Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly
1				5						10

<210> 79

<211> 23

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR1 IGKV6D-21

<400> 79

Glu	Tyr	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Phe	Gln	Ser	Val	Thr	Pro	Lys
1				5					10				15		

Glu	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
		20				

<210> 80

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR2 IGKV6D-21

<400> 80

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Val	Ile	Tyr
1				5					10				15	

<210> 81

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR3 IGKV6D-21

<400> 81

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Asp Ala Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 82

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR4 IGKV6D-21/JK

<400> 82

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
1 5 10

<210> 83

<211> 23

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR1 IGKV3D-15

<400> 83

Glu Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
20

<210> 84

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR2 IGKV3D-15

<400> 84

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Val Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 85

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR3 IGKV3D-15

<400> 85

Asp Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asp Glu Ala Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 86

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR4 IGKV3D-15/JK

<400> 86

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10

<210> 87

<211> 23

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR1 IGKV4-1

<400> 87

Asp Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys  
 20

<210> 88

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR2 IGKV4-1

<400> 88

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 89

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR3 IGKV4-1

<400> 89

Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Asp	Asp	Ala	Thr
1					5				10					15	

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

<210> 90

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR4 IGKV4-1/JK

<400> 90

Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
1				5				10		

<210> 91

<211> 22

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR1 IGLV3-1

<400> 91

Leu	Pro	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Pro	Gly	Gln
1				5				10				15		

Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys
			20		

<210> 92

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR2 IGLV3-1

<400> 92

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
1				5				10				15		

<210> 93

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR3 IGLV3-1

<400> 93

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys  
20 25 30

<210> 94

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR4 IGLV3-1/JL

<400> 94

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
1 5 10

<210> 95

<211> 22

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR1 IGLV3-1

<400> 95

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys  
20

<210> 96

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR2 IGLV3-1

<400> 96

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 97

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR3 IGLV3-1

<400> 97

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys  
20 25 30

<210> 98

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Акцепторная последовательность легкой цепи FR4 IGLV3-1/JL

<400> 98

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
1 5 10

<210> 99

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность CDR-H1 анти-DLL4 антитела

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X представляет собой S или N

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X представляет собой S, G или N

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X представляет собой S, N, T, G или R

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X представляет собой Y или H

<400> 99

Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Trp Gly

1 5

<210> 100

<211> 16

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность  
<220>  
<223> Консенсусная последовательность CDR-H2 анти-DLL4 антитела

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> X представляет собой Y, N или S

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5)..(5)  
<223> X представляет собой T, N, A, I, S или R

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7)..(7)  
<223> X представляет собой S, N, T или G

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (16)..(16)  
<223> X представляет собой S, N, D или G

<400> 100

Asp	Ile	Xaa	Tyr
Xaa	Tyr	Xaa	Gly
			Xaa

1                        5                        10                      15

<210> 101  
<211> 11  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Консенсусная последовательность CDR-H3 анти-DLL4 антитела

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> X представляет собой E, Y, F, Q, W, L или A

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> X представляет собой D, A, S, G, V, E или N

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> X представляет собой V, M, L, P или A

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> X представляет собой I, A, P, R, S, K, Q, V, G, M, или E

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5)..(5)

<223> X представляет собой L, Y, F или M  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6)..(6)  
<223> X представляет собой R, G, S, Q или A  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (8)..(8)  
<223> X представляет собой G, A или S  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (9)..(9)  
<223> X представляет собой S, A, L, V, R или G  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (11)..(11)  
<223> X представляет собой Y, D, S, N, H, E, R, L, P, C, I, M, T, Q или K  
<400> 101

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Asp Xaa  
1 5 10

<210> 102  
<211> 11  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность  
<220>  
<223> Консенсусная последовательность CDR-L1 анти-DLL4 антитела

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> X представляет собой Q, E или D  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> X представляет собой R, S, G, M, K, L или T  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7)..(7)  
<223> X представляет собой D или E

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (10)..(10)  
<223> X представляет собой A или V  
<400> 102

Ser Gly Xaa Xaa Leu Gly Xaa Lys Tyr Xaa Ser  
1 5 10

<210> 103

<211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Консенсусная последовательность CDR-L2 анти-DLL4 антитела

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X представляет собой E или Q  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> X представляет собой S, L, T, A, E или F  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> X представляет собой K, T, E, N, Q, S или M  
 <400> 103

Xaa Asp Xaa Xaa Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 104  
 <211> 9  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Консенсусная последовательность CDR-L3 анти-DLL4 антитела

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> X представляет собой R, S, M, E, N, G или K  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> X представляет собой D или E  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> X представляет собой T, V, A, S или M  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> X представляет собой G, A или C

<400> 104

Gln Ala Trp Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Val  
 1 5

<210> 105  
 <211> 5  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Консенсусная последовательность CDR-H1 анти-DLL4 антитела

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X представляет собой S, N или D

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X представляет собой H или Y

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> X представляет собой S или H

<400> 105

Xaa Xaa Trp Met Xaa  
 1 5

<210> 106  
 <211> 17  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Консенсусная последовательность CDR-H2 анти-DLL4 антитела

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> X представляет собой I, D, M или T

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> X представляет собой Y, N, S, Q, V, T, H или D

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> X представляет собой S, R, I, T, G, K, H или N

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> X представляет собой N, Y, S, I или T

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> X представляет собой K, M, N, Q, E, T, R, S, A или L

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (10)..(10)  
<223> X представляет собой Y, D или E

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (11)..(11)  
<223> X представляет собой S или Y

<400> 106

Xaa Ile Ser Xaa Asp Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 107  
<211> 10  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Консенсусная последовательность CDR-H3 анти-DLL4 антитела

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> X представляет собой G, A или R

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> X представляет собой G, S или A

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6)..(6)  
<223> X представляет собой V или M

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (8)..(8)  
<223> X представляет собой F, L, Y или M

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (10)..(10)  
<223> X представляет собой I, S или L

<400> 107

Ala Xaa Gly Xaa Asn Xaa Gly Xaa Asp Xaa  
1 5 10

<210> 108  
<211> 11  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Консенсусная последовательность CDR-L1 анти-DLL4 антитела

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> X представляет собой A или G

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> X представляет собой K, N, L, Q, M, E, S, T, G или D

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> X представляет собой T, S, N, A, G или E

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> X представляет собой K, Q, N или R

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> X представляет собой V или I

<400> 108

Ser Xaa Asp Xaa Leu Gly Xaa Xaa Tyr Xaa Ser  
 1 5 10

<210> 109  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Консенсусная последовательность CDR-L2 анти-DLL4 антитела

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> X представляет собой A, G, W, S или D

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> X представляет собой K, M, Q, N, L, T, I или E

<400> 109

Gln Asp Xaa Xaa Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 110  
 <211> 9  
 <212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Консенсусная последовательность CDR-L3 анти-DLL4 антитела

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X представляет собой S или A

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X представляет собой R, S, Q, P, A, V, W или M

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X представляет собой S, G, I, N, R или T

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X представляет собой D или G

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> X представляет собой V, A, P или E

<400> 110

Gln Ser Trp Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Val  
1 5

<210> 111

<211> 106

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 111

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
 85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Arg Val Thr Val Leu  
 100 105

<210> 112  
 <211> 119  
 <212> БЕЛЮК  
 <213> Homo sapiens

<400> 112

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Ser Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His  
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Ile Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Ser Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Ala Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 113  
 <211> 106  
 <212> БЕЛЮК  
 <213> Homo sapiens

<400> 113

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Lys Leu Gly Thr Lys Tyr Val  
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Gln Asp Ala Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Ser Trp Asp Arg Ser Asp Val Val  
 85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
 100 105

<210> 114  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> мутации в последовательности VH антитела E9

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (30)..(30)  
 <223> X представляет собой S, N, G или R

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (31)..(31)  
 <223> X представляет собой S или N

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (32)..(32)  
 <223> X представляет собой S, G или N

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (33)..(33)  
 <223> X представляет собой S, N, T, G или R

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (42)..(42)  
 <223> X представляет собой P, S или L

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (54)..(54)  
 <223> X представляет собой Y или N

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (56)..(56)  
 <223> X представляет собой T, N, A, I, S или R

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE

<222> (58)..(58)  
 <223> X представляет собой S, N, T или G

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (67)..(67)  
 <223> X представляет собой S, N, D или G

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (90)..(90)  
 <223> X представляет собой A или E

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (100)..(100)  
 <223> X представляет собой E, Y, F, Q, W, L или A

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (101)..(101)  
 <223> X представляет собой D, A, S, G, V, E или N

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (102)..(102)  
 <223> X представляет собой V, M, L или P

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (103)..(103)  
 <223> X представляет собой I, A, P, R, S, K, Q, V, G, M или E

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (104)..(104)  
 <223> X представляет собой L, Y, F или M

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (105)..(105)  
 <223> X представляет собой R, G, S, Q или A

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (107)..(107)  
 <223> X представляет собой G, S или A

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (108)..(108)  
 <223> X представляет собой S, A, L, V или R

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (110)..(110)  
 <223> X представляет собой Y, D, S, N, H, E, R, L, P, C, I или M

<400> 114

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1					5					10					15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30

Xaa Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Xaa Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Xaa Tyr Xaa Gly Xaa Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Xaa Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Xaa Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Asp Xaa Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 115  
<211> 106  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> мутации в последовательности VL антитела E9

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (25)..(25)  
<223> X представляет собой Q, E или D

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (26)..(26)  
<223> X представляет собой R, S, G, M, K, L или T

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (29)..(29)  
<223> X представляет собой D или E

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (32)..(32)  
<223> X представляет собой A или V

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (49)..(49)  
<223> X представляет собой E или Q

<220>  
<221> MISC\_FEATURE

<222> (51)..(51)  
<223> X представляет собой S, L, T, A, E или F

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (52)..(52)  
<223> X представляет собой K, T, E, N, Q, S или M

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (79)..(79)  
<223> X представляет собой P или A

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (92)..(92)  
<223> X представляет собой R, S, M, E, N или K

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (93)..(93)  
<223> X представляет собой D или E

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (94)..(94)  
<223> X представляет собой T, V, A, S или M

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (95)..(95)  
<223> X представляет собой G, A или C

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (99)..(99)  
<223> X представляет собой Y или S

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (102)..(102)  
<223> X представляет собой R или K

<400> 115

Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln
1															
														15	

Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Xaa	Xaa	Leu	Gly	Xaa	Lys	Tyr	Xaa
														30	
20															

Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
														45	
35															

Xaa	Asp	Xaa	Xaa	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
50															

Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Xaa	Met
														80	
65															

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Val  
 85 90 95

Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Val Thr Val Leu  
 100 105

<210> 116  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область аффинно зрелого анти-DLL4 антитела E9.4  
 <400> 116

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Tyr Asp Val Ser Leu Gly Gly Ser Ser Asp His Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 117  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.4  
 <400> 117

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly  
 1 5

<210> 118  
<211> 16  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.4  
<400> 118

Asp	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

<210> 119  
<211> 11  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность  
<220>  
<223> CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.4  
<400> 119

Tyr	Asp	Val	Ser	Leu	Gly	Gly	Ser	Ser	Asp	His
1				5					10	

<210> 120  
<211> 121  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность  
<220>  
<223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.11  
<400> 120

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5				10					15		

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser
				20				25				30			

Ser	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
				35			40				45				

Trp	Ile	Gly	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50				55				60						

Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe
	65				70				75			80			

Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				85				90			95				

Cys	Ala	Arg	Glu	Ala	Val	Pro	Leu	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Tyr	Trp	Gly
				100				105			110				

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 121  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.11

<400> 121

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly  
 1 5

<210> 122  
 <211> 16  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.11

<400> 122

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

<210> 123  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.11

<400> 123

Glu Ala Val Pro Leu Gly Gly Ser Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 124  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.14

<400> 124

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Ser  
 20 25 30

Arg Tyr His Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 125

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.14

<400> 125

Asn Ser Arg Tyr His Trp Gly  
 1 5

<210> 126

<211> 16

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.14

<400> 126

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

<210> 127

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.14

<400> 127

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 128  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.17  
 <400> 128

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Glu Ala Ile Leu Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 129  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.17  
 <400> 129

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly  
 1 5

<210> 130  
 <211> 16  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.17

&lt;400&gt; 130

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser		
1	5	10
		15

&lt;210&gt; 131

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.17

&lt;400&gt; 131

Glu Glu Ala Ile Leu Gly Gly Ser Asp Tyr		
1	5	10

&lt;210&gt; 132

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH-область анти-DLL4 антитела E9.18

&lt;400&gt; 132

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu		
1	5	10
		15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser		
20	25	30

Gly Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
35	40	45

Trp Ile Gly Asp Ile Asn Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser		
50	55	60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe		
65	70	75
		80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
85	90	95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly		
100	105	110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120	

<210> 133  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.18

<400> 133

Ser Ser Gly Tyr Tyr Trp Gly  
1 5

<210> 134  
<211> 16  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.18

<400> 134

Asp Ile Asn Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 135  
<211> 11  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.18

<400> 135

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr  
1 5 10

<210> 136  
<211> 121  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.19

<400> 136

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Phe Asp Val Ser Leu Gly Gly Ser Asp Thr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 137

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.19

<400> 137

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly  
 1 5

<210> 138

<211> 16

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.19

<400> 138

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

<210> 139

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.19

<400> 139

Phe Asp Val Ser Leu Gly Gly Ser Asp Thr  
 1 5 10

<210> 140  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.22

<400> 140

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5					10				15		

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Ser  
 20 25 30

Arg Tyr His Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 141  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.22

<400> 141

Asn	Ser	Arg	Tyr	His	Trp	Gly
1				5		

<210> 142  
 <211> 16  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.22

&lt;400&gt; 142

Asp	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Gly
1															15
5															10

&lt;210&gt; 143

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.22

&lt;400&gt; 143

Glu	Asp	Val	Ile	Leu	Arg	Gly	Gly	Ser	Asp	Tyr
1										
5										10

&lt;210&gt; 144

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH-область анти-DLL4 антитела E9.48

&lt;400&gt; 144

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1															15
5														10	

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	
20															25	30

Gly	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	
35															40	45

Trp	Ile	Gly	Asp	Ile	Asn	Tyr	Arg	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	
50															55	60

Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe		
65															70	75	80

Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr		
85															90	95	

Cys	Ala	Arg	Glu	Asp	Val	Ile	Leu	Arg	Gly	Gly	Ser	Asp	Tyr	Trp	Gly		
100															105	110	

Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
115								120		

&lt;210&gt; 145

&lt;211&gt; 7

<212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.48

<400> 145

Ser Ser Gly Tyr Tyr Trp Gly  
 1 5

<210> 146  
 <211> 16  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.48

<400> 146

Asp Ile Asn Tyr Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

<210> 147  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.48

<400> 147

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 148  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.65

<400> 148

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Asn Ser  
 20 25 30

Arg Tyr His Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 149  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.65

<400> 149

Asn Ser Arg Tyr His Trp Gly  
 1 5

<210> 150  
 <211> 16  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.65

<400> 150

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly  
 1 5 10 15

<210> 151  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.65

<400> 151

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 152  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH-область анти-DLL4 антитела E9.66

&lt;400&gt; 152

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5						10			15		

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser
				20				25					30		

Ser	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
				35			40				45				

Trp	Ile	Gly	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50				55				60						

Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe
	65				70				75			80			

Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				85				90				95			

Cys	Ala	Arg	Glu	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Gly	Gly	Ala	Asp	Lys	Trp	Gly
			100					105			110				

Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

&lt;210&gt; 153

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.66

&lt;400&gt; 153

Ser	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Trp	Gly									
1				5											

&lt;210&gt; 154

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.66

&lt;400&gt; 154

Asp	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1					5				10			15			

<210> 155  
<211> 11  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-Н3 анти-DLL4 антитела E9.66  
  
<400> 155

Glu Gly Val Pro Leu Gly Gly Ala Asp Lys  
1 5 10

<210> 156  
<211> 121  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.71  
  
<400> 156

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Gln Ala Leu Ala Met Gly Gly Gly Ser Asp Lys Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 157  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

&lt;223&gt; CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.71

&lt;400&gt; 157

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly  
 1 5

&lt;210&gt; 158

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.71

&lt;400&gt; 158

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 159

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.71

&lt;400&gt; 159

Gln Ala Leu Ala Met Gly Gly Ser Asp Lys  
 1 5 10

&lt;210&gt; 160

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH-область анти-DLL4 антитела E9.13

&lt;400&gt; 160

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 161  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.13

<400> 161

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly  
 1 5

<210> 162  
 <211> 16  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.13

<400> 162

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

<210> 163  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.13

<400> 163

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 164  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.16

&lt;400&gt; 164

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1					5					10				15	

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser
							20		25				30		

Ser	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
						35		40				45			

Trp	Ile	Gly	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50				55					60					

Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe
	65					70			75				80		

Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				85				90					95		

Cys	Ala	Arg	Glu	Asp	Val	Ile	Leu	Arg	Gly	Gly	Ser	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100				105					110			

Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
					115		120	

&lt;210&gt; 165

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.16

&lt;400&gt; 165

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly

1 5

&lt;210&gt; 166

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.16

&lt;400&gt; 166

Asp	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1					5				10				15		

&lt;210&gt; 167

&lt;211&gt; 11

<212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.16

<400> 167

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 168  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.38

<400> 168

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 169  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.38

<400> 169

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly  
1 5

<210> 170  
<211> 16  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.38  
  
<400> 170

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 171  
<211> 11  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.38  
  
<400> 171

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr  
1 5 10

<210> 172  
<211> 121  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.2B  
  
<400> 172

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
20 25 30

Asn Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Asn Tyr Asn Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Leu Gly Gly Gly Ala Asp Asp Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 173  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.2B

<400> 173

Ser Ser Asn Tyr Tyr Trp Gly  
 1 5

<210> 174  
 <211> 16  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.2B

<400> 174

Asp Ile Asn Tyr Asn Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

<210> 175  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.2B

<400> 175

Glu Ala Val Ala Leu Gly Gly Ala Asp Asp  
 1 5 10

<210> 176  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.1F

<400> 176

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Asn Tyr Ile Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ala Val Ser Phe Gly Gly Ala Asp Ser Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 177  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.1F

<400> 177

Ser Gly Ser Tyr Tyr Trp Gly  
 1 5

<210> 178  
<211> 16  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.1F

<400> 178

Asp Ile Asn Tyr Ile Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

<210> 179  
<211> 11  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

&lt;223&gt; CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.1F

&lt;400&gt; 179

Glu	Ala	Val	Ser	Phe	Gly	Gly	Gly	Ala	Asp	Ser
1				5				10		

&lt;210&gt; 180

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH-область анти-DLL4 антитела E9.10H

&lt;400&gt; 180

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5				10				15			

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser
				20				25				30			

Gly	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
				35			40				45				

Trp	Ile	Gly	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50				55				60						

Leu	Lys	Asn	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe
65					70				75			80			

Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				85				90			95				

Cys	Ala	Arg	Glu	Glu	Val	Ile	Leu	Gly	Gly	Gly	Ala	Asp	Gln	Trp	Gly
					100			105			110				

Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
				115			120	

&lt;210&gt; 181

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.10H

&lt;400&gt; 181

Ser	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Gly
1				5		

<210> 182  
<211> 16  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.10H  
  
<400> 182

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn  
1 5 10 15

<210> 183  
<211> 11  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.10H  
  
<400> 183

Glu Glu Val Ile Leu Gly Gly Ala Asp Gln  
1 5 10

<210> 184  
<211> 121  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.5E  
  
<400> 184

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Asn Tyr Ile Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ser Val Pro Leu Gly Gly Ala Asp Glu Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 185  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.5E  
  
 <400> 185

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly  
 1 5

<210> 186  
 <211> 16  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.5E  
  
 <400> 186

Asp Ile Asn Tyr Ile Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

<210> 187  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.5E  
  
 <400> 187

Glu Ser Val Pro Leu Gly Gly Gly Ala Asp Glu  
 1 5 10

<210> 188  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.10C  
  
 <400> 188

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Gln Ala Val Met Tyr Gly Gly Ser Asp Asn Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 189  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.10C  
 <400> 189

Ser Gly Ser Tyr Tyr Trp Gly  
 1 5

<210> 190  
 <211> 16  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.10C  
 <400> 190

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

<210> 191  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.10C  
 <400> 191

Gln Ala Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Asp Asn  
 1 5 10

<210> 192  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.7E  
 <400> 192

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Met Ile Leu Gly Gly Gly Ala Asp Asn Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 193  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.7E  
 <400> 193

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly  
 1 5

<210> 194  
 <211> 16  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.7E

&lt;400&gt; 194

Asp	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Asp
1				5				10					15		

&lt;210&gt; 195

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.7E

&lt;400&gt; 195

Glu	Asp	Met	Ile	Leu	Gly	Gly	Ala	Asp	Asn
1				5			10		

&lt;210&gt; 196

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH-область анти-DLL4 антитела E9.12B

&lt;400&gt; 196

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5			10					15			

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser
				20				25				30			

Asn	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
					35			40				45			

Trp	Ile	Gly	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
				50			55			60					

Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe
				65			70			75			80		

Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				85				90				95			

Cys	Ala	Arg	Glu	Ala	Val	Ser	Phe	Gly	Gly	Gly	Ala	Asp	Ser	Trp	Gly
					100			105				110			

Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
				115			120	

<210> 197  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.12B  
  
<400> 197

Ser Ser Asn Tyr Tyr Trp Gly  
1 5

<210> 198  
<211> 16  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.12B  
  
<400> 198

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 199  
<211> 11  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.12B  
  
<400> 199

Glu Ala Val Ser Phe Gly Gly Ala Asp Ser  
1 5 10

<210> 200  
<211> 121  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.10E  
  
<400> 200

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Gly  
20 25 30

Asn Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Met Tyr Gly Gly Gly Asp Ser Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 201

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.10E

<400> 201

Ser Gly Asn Tyr Tyr Trp Gly  
 1 5

<210> 202

<211> 16

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.10E

<400> 202

Asp Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

<210> 203

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.10E

<400> 203

Glu Asp Val Met Tyr Gly Gly Gly Asp Ser  
 1 5 10

<210> 204  
<211> 121  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.6A

<400> 204

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Asn Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Leu Gly Gly Gly Ala Asp Ser Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 205  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.6A

<400> 205

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly  
1 5

<210> 206  
<211> 16  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.6A

&lt;400&gt; 206

Asp Ile Asn Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn			
1	5	10	15

&lt;210&gt; 207

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.6A

&lt;400&gt; 207

Glu Ala Val Ala Leu Gly Gly Gly Ala Asp Ser		
1	5	10

&lt;210&gt; 208

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH-область анти-DLL4 антитела E9.7A

&lt;400&gt; 208

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu			
1	5	10	15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser		
20	25	30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
35	40	45

Trp Ile Gly Asp Ile Asn Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser		
50	55	60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe			
65	70	75	80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
85	90	95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala Asp Leu Trp Gly		
100	105	110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
115	120

&lt;210&gt; 209

&lt;211&gt; 7

<212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.7A

<400> 209

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly  
 1 5

<210> 210  
 <211> 16  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.7A

<400> 210

Asp Ile Asn Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

<210> 211  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.7A

<400> 211

Glu Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala Asp Leu  
 1 5 10

<210> 212  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.8H

<400> 212

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ser Val Pro Leu Gly Gly Gly Ala Asp Asn Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 213

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR-H1 анти-DLL4 антитела E9.8H

<400> 213

Ser Gly Ser Tyr Tyr Trp Gly  
 1 5

<210> 214

<211> 16

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR-H2 анти-DLL4 антитела E9.8H

<400> 214

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn  
 1 5 10 15

<210> 215

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR-H3 анти-DLL4 антитела E9.8H

<400> 215

Glu Ser Val Pro Leu Gly Gly Ala Asp Asn  
 1 5 10

<210> 216

<211> 106

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VL-область анти-DLL4 антитела E9.13

&lt;400&gt; 216

Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln
1															15

Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asp	Thr	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Val
															30
20															30

Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
															45
35															45

Glu	Asp	Ser	Glu	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
															60
50															60

Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Pro	Met
															80
65															80

Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Trp	Asp	Ser	Glu	Thr	Gly	Val
															95
85															95

Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu						
100															105

&lt;210&gt; 217

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.13

&lt;400&gt; 217

Ser	Gly	Asp	Thr	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Val	Ser					
1															
															10

&lt;210&gt; 218

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.13

&lt;400&gt; 218

Glu	Asp	Ser	Glu	Arg	Pro	Ser									
1															5

&lt;210&gt; 219

&lt;211&gt; 9

<212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.13  
 <400> 219

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val  
 1 5

<210> 220  
 <211> 106  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VL-область анти-DLL4 антитела E9.16  
 <400> 220

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val  
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Glu Asp Phe Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
 85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
 100 105

<210> 221  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.16  
 <400> 221

Ser Gly Glu Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser  
 1 5 10

<210> 222  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.16  
  
<400> 222

Glu Asp Phe Lys Arg Pro Ser  
1 5

<210> 223  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.16  
  
<400> 223

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
1 5

<210> 224  
<211> 106  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL-область анти-DLL4 антитела E9.38  
  
<400> 224

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Val Gly Val  
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100 105

<210> 225  
<211> 11  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.38

<400> 225

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser  
1 5 10

<210> 226  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.38

<400> 226

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser  
1 5

<210> 227  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.38

<400> 227

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Val Gly Val  
1 5

<210> 228  
<211> 106  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL-область анти-DLL4 антитела E9.4

<400> 228

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
 85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
 100 105

<210> 229  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.4

<400> 229

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser  
 1 5 10

<210> 230  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.4

<400> 230

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 231  
 <211> 9  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.4

<400> 231

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
 1 5

<210> 232  
 <211> 106  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VL-область анти-DLL4 антитела E9.11

&lt;400&gt; 232

Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln
1															15

Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Gln	Arg	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Ala
															30
20															

Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
															45
35															

Glu	Asp	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
															60
50															

Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Pro	Met
															80
65															

Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Trp	Asp	Arg	Asp	Thr	Gly	Val
															95
85															

Phe	Gly	Tyr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu						
100															

&lt;210&gt; 233

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.11

&lt;400&gt; 233

Ser	Gly	Gln	Arg	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Ala	Ser					
1															
5															10

&lt;210&gt; 234

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.11

&lt;400&gt; 234

Glu	Asp	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser									
1															
															5

&lt;210&gt; 235

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.11

&lt;400&gt; 235

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

1 5

&lt;210&gt; 236

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VL-область анти-DLL4 антитела E9.14

&lt;400&gt; 236

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
20 25 30Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met  
65 70 75 80Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
85 90 95Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100 105

&lt;210&gt; 237

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.14

&lt;400&gt; 237

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 238  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.14  
  
<400> 238

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser  
1 5

<210> 239  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.14  
  
<400> 239

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
1 5

<210> 240  
<211> 106  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL-область анти-DLL4 антитела E9.17  
  
<400> 240

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100 105

<210> 241  
<211> 11  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.17

<400> 241

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser  
1 5 10

<210> 242  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.17

<400> 242

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser  
1 5

<210> 243  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.17

<400> 243

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
1 5

<210> 244  
<211> 106  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL-область анти-DLL4 антитела E9.18

<400> 244

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
 85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
 100 105

<210> 245  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.18

<400> 245

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser  
 1 5 10

<210> 246  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.18

<400> 246

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 247  
 <211> 9  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.18

<400> 247

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
 1 5

<210> 248  
 <211> 106  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VL-область анти-DLL4 антитела E9.19

&lt;400&gt; 248

Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln
1															15
5															

Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Gln	Arg	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Ala
															30
20                    25															

Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
															45
35                    40															

Glu	Asp	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
															60
50                    55															

Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Pro	Met
															80
65                    70                    75															

Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Trp	Asp	Arg	Asp	Thr	Gly	Val
															95
85                    90															

Phe	Gly	Tyr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu
100                    105									

&lt;210&gt; 249

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.19

&lt;400&gt; 249

Ser	Gly	Gln	Arg	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Ala	Ser
1										
5                    10										

&lt;210&gt; 250

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.19

&lt;400&gt; 250

Glu	Asp	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser
1						
5						

&lt;210&gt; 251

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.19

&lt;400&gt; 251

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

1 5

&lt;210&gt; 252

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VL-область анти-DLL4 антитела E9.22

&lt;400&gt; 252

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
20 25 30Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met  
65 70 75 80Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
85 90 95Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100 105

&lt;210&gt; 253

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.22

&lt;400&gt; 253

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser  
1 5 10

<210> 254  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.22

<400> 254

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser  
1 5

<210> 255  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.22

<400> 255

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
1 5

<210> 256  
<211> 106  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL-область анти-DLL4 антитела E9.48

<400> 256

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100 105

<210> 257  
<211> 11  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.48  
  
<400> 257

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser  
1 5 10

<210> 258  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.48  
  
<400> 258

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser  
1 5

<210> 259  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.48  
  
<400> 259

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
1 5

<210> 260  
<211> 106  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL-область анти-DLL4 антитела E9.65  
  
<400> 260

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
 85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
 100 105

<210> 261  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.65

<400> 261

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser  
 1 5 10

<210> 262  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.65

<400> 262

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 263  
 <211> 9  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.65

<400> 263

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
 1 5

<210> 264  
 <211> 106  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VL-область анти-DLL4 антитела E9.66

&lt;400&gt; 264

Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln
1															15
5															
10															

Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Gln	Arg	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Ala
															30
20															
25															

Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
															45
35															
40															

Glu	Asp	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
															60
50															
55															

Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Pro	Met
															80
65															
70															
75															

Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Trp	Asp	Arg	Asp	Thr	Gly	Val
															95
85															
90															

Phe	Gly	Tyr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu						
															105
100															

&lt;210&gt; 265

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.66

&lt;400&gt; 265

Ser	Gly	Gln	Arg	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Ala	Ser					
1															10
5															

&lt;210&gt; 266

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.66

&lt;400&gt; 266

Glu	Asp	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser									
1															5

&lt;210&gt; 267

&lt;211&gt; 9

<212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.66

<400> 267

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
 1 5

<210> 268  
 <211> 106  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VL-область анти-DLL4 антитела E9.71

<400> 268

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
 85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
 100 105

<210> 269  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.71

<400> 269

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser  
 1 5 10

<210> 270  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.71  
  
<400> 270

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser  
1 5

<210> 271  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.71  
  
<400> 271

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
1 5

<210> 272  
<211> 106  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL-область анти-DLL4 антитела E9.2B  
  
<400> 272

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gly Asp Lys Tyr Val  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Glu Asp Ser Thr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val  
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100 105

<210> 273  
<211> 11  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.2B  
  
<400> 273

Ser Gly Glu Gly Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser  
1 5 10

<210> 274  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.2B  
  
<400> 274

Glu Asp Ser Thr Arg Pro Ser  
1 5

<210> 275  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.2B  
  
<400> 275

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val  
1 5

<210> 276  
<211> 106  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL-область анти-DLL4 антитела E9.1F  
  
<400> 276

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Glu Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Met Glu Ala Gly Val  
 85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
 100 105

<210> 277  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.1F

<400> 277

Ser Gly Asp Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser  
 1 5 10

<210> 278  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.1F

<400> 278

Glu Asp Ser Gln Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 279  
 <211> 9  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.1F

<400> 279

Gln Ala Trp Asp Met Glu Ala Gly Val  
 1 5

<210> 280  
 <211> 104  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VL-область анти-DLL4 антитела E9.10C

&lt;400&gt; 280

Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln
1															15
5															

Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asp	Ser	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Val
															30
20                    25															

Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
															45
35                    40															

Glu	Asp	Ser	Glu	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
															60
50                    55															

Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Ala	Met
															80
65                    70                    75															

Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Trp	Asp	Ser	Glu	Thr	Gly	Val
															95
85                    90															

Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Val	Thr
100							

&lt;210&gt; 281

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.10C

&lt;400&gt; 281

Ser	Gly	Asp	Ser	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Val	Ser
1										
5                    10										

&lt;210&gt; 282

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.10C

&lt;400&gt; 282

Glu	Asp	Ser	Glu	Arg	Pro	Ser
1						
5						

&lt;210&gt; 283

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.10C

&lt;400&gt; 283

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val  
 1                       5

&lt;210&gt; 284

&lt;211&gt; 104

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VL-область анти-DLL4 антитела E9.10E

&lt;400&gt; 284

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1                       5                           10                       15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gly Asp Lys Tyr Val  
 20                      25                           30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35                      40                           45

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50                      55                           60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
 65                      70                           75                       80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Glu Ala Gly Val  
 85                      90                           95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr  
 100

&lt;210&gt; 285

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.10E

&lt;400&gt; 285

Ser Gly Glu Gly Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser  
 1                       5                           10

<210> 286  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.10E

<400> 286

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser  
1 5

<210> 287  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.10E

<400> 287

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Ala Gly Val  
1 5

<210> 288  
<211> 104  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL-область анти-DLL4 антитела E9.7E

<400> 288

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Glu Ala Gly Val  
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr  
100

<210> 289  
<211> 11  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.7E  
  
<400> 289

Ser Gly Asp Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser  
1 5 10

<210> 290  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.7E  
  
<400> 290

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser  
1 5

<210> 291  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.7E  
  
<400> 291

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Ala Gly Val  
1 5

<210> 292  
<211> 104  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL-область анти-DLL4 антитела E9.5E  
  
<400> 292

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Met Leu Gly Asp Lys Tyr Val  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Glu Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val  
 85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr  
 100

<210> 293  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.5E

<400> 293

Ser Gly Asp Met Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser  
 1 5 10

<210> 294  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.5E

<400> 294

Glu Asp Ser Gln Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 295  
 <211> 9  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.5E

<400> 295

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val  
 1 5

<210> 296  
 <211> 104  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VL-область анти-DLL4 антитела E9.12B

&lt;400&gt; 296

Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln
1															15

Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asp	Gly	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Val
															30
20															

Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
35															45

Glu	Asp	Ser	Thr	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
50															60

Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Pro	Met
65															80

Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Trp	Asp	Ser	Glu	Ser	Gly	Val
85															95

Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Val	Thr
100							

&lt;210&gt; 297

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.12B

&lt;400&gt; 297

Ser	Gly	Asp	Gly	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Val	Ser
1										
										10

&lt;210&gt; 298

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.12B

&lt;400&gt; 298

Glu	Asp	Ser	Thr	Arg	Pro	Ser
1						
						5

&lt;210&gt; 299

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.12B

&lt;400&gt; 299

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Ser Gly Val

1 5

&lt;210&gt; 300

&lt;211&gt; 104

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VL-область анти-DLL4 антитела E9.10H

&lt;400&gt; 300

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val  
20 25 30Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
65 70 75 80Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Gly Glu Thr Gly Val  
85 90 95Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr  
100

&lt;210&gt; 301

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.10H

&lt;400&gt; 301

Ser Gly Glu Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 302  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.10H  
  
<400> 302

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser  
1 5

<210> 303  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.10H  
  
<400> 303

Gln Ala Trp Asp Gly Glu Thr Gly Val  
1 5

<210> 304  
<211> 104  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL-область анти-DLL4 антитела E9.6A  
  
<400> 304

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Met Leu Gly Asp Lys Tyr Val  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Glu Asp Thr Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val  
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr  
100

<210> 305  
<211> 11  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.6A  
  
<400> 305

Ser Gly Asp Met Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser  
1 5 10

<210> 306  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.6A  
  
<400> 306

Glu Asp Thr Asn Arg Pro Ser  
1 5

<210> 307  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.6A  
  
<400> 307

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val  
1 5

<210> 308  
<211> 104  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL-область анти-DLL4 антитела E9.7A  
  
<400> 308

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Gln Asp Ala Met Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Met Glu Thr Gly Val  
 85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr  
 100

<210> 309  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.7A

<400> 309

Ser Gly Glu Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser  
 1 5 10

<210> 310  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.7A

<400> 310

Gln Asp Ala Met Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 311  
 <211> 9  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.7A

<400> 311

Gln Ala Trp Asp Met Glu Thr Gly Val  
 1 5

<210> 312  
 <211> 104  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VL-область анти-DLL4 антитела E9.8H

&lt;400&gt; 312

Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln
1															

5

10

15

Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Glu	Ser	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Val

20

25

30

Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr

35

40

45

Glu	Asp	Ser	Met	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser

50

55

60

Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Pro	Met

65

70

75

80

Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Trp	Asp	Ser	Glu	Val	Gly	Val

85

90

95

Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Val	Thr

100

&lt;210&gt; 313

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.8H

&lt;400&gt; 313

Ser	Gly	Glu	Ser	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Val	Ser
1										

5

10

&lt;210&gt; 314

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.8H

&lt;400&gt; 314

Glu	Asp	Ser	Met	Arg	Pro	Ser
1						

5

&lt;210&gt; 315

&lt;211&gt; 9

<212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.8H

<400> 315

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Val Gly Val  
 1 5

<210> 316  
 <211> 119  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела A10.3

<400> 316

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Ser Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His  
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Ile Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Ser Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Ala Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 317  
 <211> 119  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела A10.K30

<400> 317

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asn His  
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gly Arg Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Ala Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 318  
 <211> 119  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела A10.K42

<400> 318

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gln Ser His  
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Met Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Ala Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 319  
 <211> 119  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела A10.9A

<400> 319

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr  
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Ala Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 320  
 <211> 119  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела A10.8A

<400> 320

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asn His  
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gly Arg Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Ala Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 321  
<211> 119  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VH-область анти-DLL4 антитела A10.1A

<400> 321

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His Ser His  
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Met Ile Ser Asp Asp Gly Arg Asn Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ala Ala Gly Gly Asn Val Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 322  
 <211> 119  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела A10.5D

<400> 322

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Ser Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser His  
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Asp Ile Ser Val Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Ser Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ala Ala Gly Gly Asn Val Gly Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 323  
 <211> 119  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела A10.3A

<400> 323

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asn His  
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gly Arg Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Ala Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 324  
<211> 119  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VH-область анти-DLL4 антитела A10.6B

<400> 324

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asn His  
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gly Arg Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Ala Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 325  
<211> 119  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH-область анти-DLL4 антитела A10.3D

<400> 325

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His  
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Asp Ile Ser Gln Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ala Ala Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 326  
<211> 119  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH-область анти-DLL4 антитела A10.4C

<400> 326

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser His  
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Asp Ile Ser Asn Asp Gly Arg Tyr Ala Tyr Ser Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Ala Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 327  
 <211> 106  
 <212> BELOK  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VL-область анти-DLL4 антитела A10.3  
 <400> 327

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Lys Leu Gly Thr Lys Tyr Val  
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Gln Asp Ala Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Ser Trp Asp Arg Ser Asp Val Val  
 85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 328  
<211> 106  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL-область анти-DLL4 антитела A10.L45  
<400> 328

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Glu Leu Gly Thr Gln Tyr Val  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Gln Asp Ala Thr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Ser Gly Val Val  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

<210> 329  
<211> 106  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL-область анти-DLL4 антитела A10.L73  
<400> 329

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Leu Gly Ser Gln Tyr Val  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Gln Asp Ala Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Ser Gly Val Val  
 85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 330  
 <211> 106  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VL-область анти-DLL4 антитела A10.3A

<400> 330

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Asn Leu Gly Glu Lys Tyr Val  
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Gln Asp Ala Thr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Ser Ser Gly Ala Val  
 85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 331  
 <211> 106  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VL-область анти-DLL4 антитела A10.6B

<400> 331

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Asn Leu Gly Asn Gln Tyr Val  
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Gln Asp Gly Met Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Trp Ser Gly Glu Val  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 332  
<211> 106  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL-область анти-DLL4 антитела A10.3D

<400> 332

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Ala Asp Lys Leu Gly Thr Lys Tyr Val  
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Gln Asp Gly Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Gln Ser Gly Ala Val  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 333  
<211> 106

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VL-область анти-DLL4 антитела A10.4C

&lt;400&gt; 333

Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln
1					5				10					15	

Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Asp	Asn	Leu	Gly	Asn	Gln	Tyr	Val
					20				25				30		

Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
					35			40					45		

Gln	Asp	Gly	Met	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
					50			55				60			

Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Ala	Met
					65			70			75		80		

Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Trp	Asp	Ser	Ser	Gly	Ala	Val
						85				90			95		

Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu						
					100			105							

&lt;210&gt; 334

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH-область анти-DLL4 антитела E9.1

&lt;400&gt; 334

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1					5				10			15			

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser
					20			25				30			

Ser	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
						35		40				45			

Trp	Ile	Gly	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
						50		55			60				

Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe
						65		70			75		80		

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 335  
 <211> 107  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VL-область анти-DLL4 антитела E9.1

<400> 335

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
 85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Arg Val Thr Val Leu Gly  
 100 105

<210> 336  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела E9-SE1

<400> 336

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Ser Phe  
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 337  
<211> 107  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL-область анти-DLL4 антитела E9-SE1

<400> 337

Leu Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
 100 105

<210> 338  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела E9-SE2

<400> 338

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Ser Phe  
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 339  
 <211> 107  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VL-область анти-DLL4 антитела E9-SE2

<400> 339

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
 85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Arg Val Thr Val Leu Gly  
 100 105

<210> 340  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела E9-SE3

<400> 340

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Tyr Leu Lys Leu Ser Ser Val Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 341  
 <211> 107

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VL-область анти-DLL4 антитела E9-SE3

&lt;400&gt; 341

Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Pro	Gly	Gln
1				5					10				15	

Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Gln	Arg	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Ala
				20				25				30			

Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
				35			40					45			

Glu	Asp	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
					50		55			60					

Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Pro	Met
					65		70			75			80		

Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Trp	Asp	Arg	Asp	Thr	Gly	Val
					85				90			95			

Phe	Gly	Tyr	Gly	Thr	Arg	Val	Thr	Val	Leu	Gly
				100			105			

&lt;210&gt; 342

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH-область анти-DLL4 антитела E9-SE4

&lt;400&gt; 342

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5				10				15			

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser
				20			25				30				

Ser	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
				35			40				45				

Trp	Ile	Gly	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
				50			55			60					

Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe
				65			70			75			80		

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 343  
 <211> 107  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VL-область анти-DLL4 антитела E9-SE4

<400> 343

Leu Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
 100 105

<210> 344  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела E9-SE5

<400> 344

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 345

<211> 108

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL-область анти-DLL4 антитела E9-SE5

<400> 345

Glu Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys  
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr  
 20 25 30

Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile  
 35 40 45

Tyr Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Asn Ser Gly Asp Asp Ala Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly  
 85 90 95

Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 346  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела E9-SE6

<400> 346

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Tyr Leu Lys Leu Ser Ser Val Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 347  
 <211> 107  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VL-область анти-DLL4 антитела E9-SE6

<400> 347

Leu Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
 100 105

<210> 348  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела E9-SE7

<400> 348

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Ser Phe  
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 349  
 <211> 108

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VL-область анти-DLL4 антитела E9-SE7

&lt;400&gt; 349

Glu	Tyr	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Phe	Gln	Ser	Val	Thr	Pro	Lys
1					5						10				15

Glu	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Gln	Arg	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr
				20				25					30		

Ala	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Val	Ile
				35			40					45			

Tyr	Glu	Asp	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50				55				60						

Ser	Asn	Ser	Gly	Asp	Asp	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn	Ser	Leu	Glu	Ala
	65				70				75				80		

Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Trp	Asp	Arg	Asp	Thr	Gly
				85				90				95			

Val	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
					100			105			

&lt;210&gt; 350

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH-область анти-DLL4 антитела E9-SE8

&lt;400&gt; 350

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Glu
1					5				10			15			

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser
				20				25			30				

Ser	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
			35			40					45				

Trp	Ile	Gly	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50				55				60						

Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe
	65					70			75			80			

Tyr Leu Lys Leu Ser Ser Val Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 351  
 <211> 108  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VL-область анти-DLL4 антитела E9-SE8

<400> 351

Glu Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys  
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr  
 20 25 30

Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile  
 35 40 45

Tyr Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Asn Ser Gly Asp Asp Ala Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly  
 85 90 95

Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 352  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела E9-FR1

<400> 352

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Thr Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Phe Asn Thr Phe  
 65 70 75 80

Phe Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 353

<211> 108

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL-область анти-DLL4 антитела E9-FR1

<400> 353

Glu Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr  
 20 25 30

Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Val Ile  
 35 40 45

Tyr Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Asn Ser Gly Asp Glu Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly  
 85 90 95

Val Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 354  
 <211> 121  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VH-область анти-DLL4 антитела E9-FR2  
 <400> 354

Glu Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 355  
 <211> 108  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> VL-область анти-DLL4 антитела E9-FR2  
 <400> 355

Asp Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr  
 20 25 30

Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile  
 35 40 45

Tyr Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Asn Ser Gly Asp Asp Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly  
 85 90 95

Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 356  
<211> 121  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.71

<400> 356

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Gln Ala Leu Ala Met Gly Gly Ser Asp Lys Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 357  
<211> 107

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VL-область анти-DLL4 антитела E9.71

&lt;400&gt; 357

Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln	
1						5								10		15

Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Gln	Arg	Leu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Ala
									25				30		

Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
						35			40					45	

Glu	Asp	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
						50			55			60			

Asn	Ser	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Pro	Met
							65		70			75		80	

Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Trp	Asp	Arg	Asp	Thr	Gly	Val
							85			90			95		

Phe	Gly	Tyr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly				
						100			105					

&lt;210&gt; 358

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH-область анти-DLL4 антитела E9.71(M)

&lt;400&gt; 358

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1								5			10		15		

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser
							20		25			30			

Ser	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
						35		40			45				

Trp	Ile	Gly	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
							50		55		60				

Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe
							65		70		75		80		

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Gln Ala Leu Ala Met Gly Gly Gly Ser Asp Lys Trp Gly  
           100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 359  
<211> 107  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> VL-область анти-DLL4 антитела E9.71 (M)

<400> 359

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105

```
<210> 360
<211> 121
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
```

<220>  
<223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.71 (L)

<400> 360

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Gln Ala Leu Ala Leu Gly Gly Ser Asp Lys Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 361

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL-область анти-DLL4 антитела E9.71(L)

<400> 361

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
           100                         105

<210> 362  
 <211> 19  
 <212> БЕЛЮК  
 <213> Homo sapiens

<400> 362

Met Ala Trp Ser Pro Leu Phe Leu Thr Leu Ile Thr His Cys Ala Gly  
       1                          5                         10                 15

Ser Trp Ala

<210> 363  
 <211> 19  
 <212> БЕЛЮК  
 <213> Homo sapiens

<400> 363

Met Ala Trp Ser Pro Leu Phe Leu Thr Leu Ile Thr His Cys Ala Arg  
       1                          5                         10                 15

Val Trp Ala

<210> 364  
 <211> 19  
 <212> БЕЛЮК  
 <213> Homo sapiens

<400> 364

Met Ala Trp Thr Pro Leu Leu Leu Pro Leu Leu Thr Phe Cys Thr Val  
       1                          5                         10                 15

Ser Glu Ala

<210> 365  
 <211> 19  
 <212> БЕЛЮК  
 <213> Homo sapiens

<400> 365

Met Ala Trp Thr Pro Leu Leu Leu Pro Leu Leu Thr Phe Cys Thr Val  
       1                          5                         10                 15

Ser Glu Ala

<210> 366  
<211> 22  
<212> БЕЛОК  
<213> Homo sapiens

<400> 366

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Arg Leu Gly Leu Leu Leu Trp  
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys  
20

<210> 367  
<211> 22  
<212> БЕЛОК  
<213> Homo sapiens

<400> 367

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Arg Leu Gly Leu Leu Leu Trp  
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys  
20

<210> 368  
<211> 30  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Сайт расщепления антитела E9.71(M)

<400> 368

Met Ala Trp Ser Pro Leu Phe Leu Thr Leu Ile Thr His Cys Ala Gly  
1 5 10 15

Ser Trp Ala Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser  
20 25 30

<210> 369  
<211> 30  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Сайт расщепления антитела E9.71(M)-1

<400> 369

Met Ala Trp Ser Pro Leu Phe Leu Thr Leu Ile Thr His Cys Ala Arg  
1 5 10 15

Val Trp Ala Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser  
20 25 30

<210> 370  
<211> 30  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Сайт расщепления антитела E9.71 (M) -2

<400> 370

Met Ala Trp Thr Pro Leu Leu Pro Leu Leu Thr Phe Cys Thr Val  
1 5 10 15

Ser Glu Ala Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser  
20 25 30

<210> 371  
<211> 29  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Сайт расщепления антитела E9.71 (M) -3

<400> 371

Met Ala Trp Thr Pro Leu Leu Pro Leu Leu Thr Phe Cys Thr Val  
1 5 10 15

Ser Glu Ala Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser  
20 25

<210> 372  
<211> 33  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Сайт расщепления антитела E9.71 (M) -4

<400> 372

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Arg Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
1 5 10 15

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

Ser

<210> 373  
<211> 32  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Сайт расщепления антитела E9.71(M)-5

&lt;400&gt; 373

Met	Asp	Met	Arg	Val	Pro	Ala	Gln	Arg	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Trp
1				5					10					15

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

&lt;210&gt; 374

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Локализация пептида в CDR

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (3)..(3)

&lt;223&gt; X может представлять собой любую аминокислоту

&lt;400&gt; 374

Phe Gly Xaa Gly

1

&lt;210&gt; 375

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Локализация пептида в CDR

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (2)..(9)

&lt;223&gt; X может представлять собой любую аминокислоту в положениях 2-9

&lt;400&gt; 375

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

&lt;210&gt; 376

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Локализация пептида в CDR

&lt;400&gt; 376

Leu Glu Trp Ile Gly  
1 5

<210> 377  
<211> 4  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Локализация пептида в CDR

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> X может представлять собой любую аминокислоту

<400> 377

Trp Gly Xaa Gly  
1