

(19) C2 (11) 105397 (13) UA

(98) вул. В. Чорновола, 25, оф. 3, м. Київ-135, 01135

(85) 2012-03-28

(74) Мошинська Ніна Миколаївна, (UA)

(45) [2014-05-12]

(43) [2012-06-25]

(24) 2014-05-12

(22) 2010-08-27

(12) Патент України (на 20 р.)

(21) а201203804

(46) 2014-05-12

(86) 2010-08-27 PCT/US2010/047006

(30) 61/238,152 2009-08-29 US 61/261,728 2009-11-16 US

(54) ТЕРАПЕВТИЧНИЙ DLL4-ЗВ'ЯЗУВАЛЬНИЙ БІЛОК ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ DLL 4-СВЯЗУЮЩИЙ БЕЛОК Normal;heading 1
;heading 2;heading 3;THERAPEUTIC DLL4 BINDING PROTEIN

(56) WO 2008076379 A2, 26.06.2008 2 WO 2008060705 A2, 22.05.2008 2 WO 2007143689 A2, 13.12.2007 2 US 2009035308 A1, 05.02.2009 2 GB 2449354 A, 19.11.2008 2 WO 2008042236 A2, 10.04.2008 2 WO 2007070671 A2, 21.06.2007 2 WO 2009124931 A2, 15.10.2009 2 WO 2009134776 A2, 05.11.2009 2 WO 2010032060 A1, 25.303.2010 2 RIDGWAY JOHN ET AL: "Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1038/NATURE05313, vol. 444, no. 7122, 21 December 2006, pages 1083-1087 3 SAINSON ET AL: "Anti-Dll4 therapy: can we block tumour growth by increasing angiogenesis?" TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE, ELSEVIER CURRENT TRENDS, GB LNKD- DOI:10.1016/J.MOLMED.2007.07.002, vol. 13, no. 9, 14 September 2007, pages 389-395 3 NOGUERA-TROISE IRENE ET AL: "Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1038/NATURE05355, vol. 444, no. 7122, 21 December 2006, pages 1032-1037 3 HOEY T ET AL: "DLL4 Blockade Inhibits Tumor Growth and Reduces Tumor-Initiating Cell Frequency" CELL STEM CELL, CELL PRESS, US LNKD- DOI:10.1016/J.STEM.2009.05.019, vol. 5, no. 2, 7 August 2009, pages 168-177 3

(71) US ЕББВИ ИНК. US ЭББВИ ИНК. US ABBVIE INC.

(72) US Бенатуил Лоренцо US Бенатуил Лоренцо US Benatuil Lorenzo US Богхарт Ервин Р. US Богхарт Эрвин Р. US Boghaert Erwin R US Гу Цицизе US Гу Цицизе US Gu, Jijie US Харрис Мария US Харрис Мария US Harris, Maria US Хиксон Джонатан А. US Хиксон Джонатан А. US Hickson, Jonathan, A. US Хсиех Чунг-Минг US Хсиех Чунг-Минг US Hsieh, Chung-Ming US Куцкова Юлия US Куцкова Юлия US Kutsikova, Yuliya US Лі Інчунь US Ли Инчунь US Li, Yingehun US Лю Чжихун US Лю Чжихун US Liu, Zhihong US Морган-Лепп Сюзан US Морган-Лепп Сюзан US Morgan-Lappe, Susan

(73) US ЕББВИ ИНК. US ЭББВИ ИНК. US ABBVIE INC.

Изобретение относится к связующему белку, который содержит антигенсвязующий домен, который способен связываться с человеческим DLL4.

Винахід належить до зв'язувального білка, який містить антигензв'язувальний домен, який здатний зв'язуватися з людським DLL4.

Disclosed is a binding protein comprising an antigen binding domain, said binding protein being capable of binding human DLL4.

1. Зв'язувальний білок, який містить антигензв'язувальний домен, причому вказаний зв'язувальний білок здатний зв'язуватися з людським DLL4, де вказаний антигензв'язувальний домен містить шість CDR: CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3, як визначено нижче:

CDR-H1, вибрана з групи, яка складається з:

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (SEQ ID NO:99), де:

X₁ являє собою S або N;

X₂ являє собою S, G або N;

X₃ являє собою S, N, T, G або R;

X₄ являє собою Y;

X₅ являє собою Y або H;

X₆ являє собою W; і

X₇ являє собою G;

залишки 31-37 SEQ ID NO:1;

SEQ ID NO:117;

SEQ ID NO:121;

SEQ ID NO:125;

SEQ ID NO:129;

SEQ ID NO:133;

SEQ ID NO:137;

SEQ ID NO:141;

SEQ ID NO:145;

SEQ ID NO:149;

SEQ ID NO:153;

SEQ ID NO:157;

SEQ ID NO:161;

SEQ ID NO:165;

SEQ ID NO:169;

SEQ ID NO:173;

SEQ ID NO:177;

SEQ ID NO:181;

SEQ ID NO:185;

SEQ ID NO:189;

SEQ ID NO:193;

SEQ ID NO:197;

SEQ ID NO:201;

SEQ ID NO:205;

SEQ ID NO:209;

SEQ ID NO:213;

залишки 31-37 SEQ ID NO:334;

залишки 31-37 SEQ ID NO:336;

залишки 31-37 SEQ ID NO:338;

залишки 31-37 SEQ ID NO:340;

залишки 31-37 SEQ ID NO:342;

залишки 31-37 SEQ ID NO:344;

залишки 31-37 SEQ ID NO:346;

залишки 31-37 SEQ ID NO:348;

залишки 31-37 SEQ ID NO:350;

залишки 31-37 SEQ ID NO:352;

залишки 31-37 SEQ ID NO:354;

залишки 31-37 SEQ ID NO:356;

залишки 31-37 SEQ ID NO:358; i

залишки 31-37 SEQ ID NO:360;

CDR-H2, вибрана з групи, яка складається з:

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆ (SEQ ID NO:100), де

X₁ являє собою D;

X₂ являє собою I;

X₃ являє собою Y, N або S;

X₄ являє собою Y;

X₅ являє собою T, N, A, I, S або R;

X₆ являє собою G;

X₇ являє собою S, N, T або G;

X₈ являє собою T;

X₉ являє собою Y;

X₁₀ являє собою Y;

X₁₁ являє собою N;

X₁₂ являє собою P;

X₁₃ являє собою S;

X₁₄ являє собою L;

X₁₅ являє собою K; i

X₁₆ являє собою S, N, D або G;

залишки 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;

SEQ ID NO:146;

SEQ ID NO:150;

SEQ ID NO:154;

SEQ ID NO:158;

SEQ ID NO:162;

SEQ ID NO:166;

SEQ ID NO:170;

SEQ ID NO:174;

SEQ ID NO:178;

SEQ ID NO:182;

SEQ ID NO:186;

SEQ ID NO:190;

SEQ ID NO:194;

SEQ ID NO:198;

SEQ ID NO:202;

SEQ ID NO:206;

SEQ ID NO:210;

SEQ ID NO:214;

залишки 52-67 SEQ ID NO:334;

залишки 52-67 SEQ ID NO:336;

залишки 52-67 SEQ ID NO:338;

залишки 52-67 SEQ ID NO:340;

залишки 52-67 SEQ ID NO:342;

залишки 52-67 SEQ ID NO:344;
залишки 52-67 SEQ ID NO:346;
залишки 52-67 SEQ ID NO:348;
залишки 52-67 SEQ ID NO:350;
залишки 52-67 SEQ ID NO:352;
залишки 52-67 SEQ ID NO:354;
залишки 52-67 SEQ ID NO:356;
залишки 52-67 SEQ ID NO:358; i
залишки 52-67 SEQ ID NO:360;
CDR-НЗ, вибрана з групи, яка складається з:
X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁ (SEQ ID NO:101), де:
X₁ являє собою E, Y, F, Q, W, L або A;
X₂ являє собою D, A, S, G, V, E або N;
X₃ являє собою V, M, L, P або A;
X₄ являє собою I, A, P, R, S, K, Q, V, G, M або E;
X₅ являє собою L, Y, F або M;
X₆ являє собою R, G, S, Q або A;
X₇ являє собою G;
X₈ являє собою G, A або S;
X₉ являє собою S, A, L, V, R або G;
X₁₀ являє собою D; i
X₁₁ являє собою Y, D, S, N, H, E, R, L, P, C, I, M, T, Q або K;
залишки 100-110 SEQ ID NO:1;
SEQ ID NO:119;
SEQ ID NO:123;
SEQ ID NO:127;
SEQ ID NO:131;
SEQ ID NO:135;
SEQ ID NO:139;
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;
SEQ ID NO:175;
SEQ ID NO:179;
SEQ ID NO:183;
SEQ ID NO:187;
SEQ ID NO:191;
SEQ ID NO:195;
SEQ ID NO:199;
SEQ ID NO:203;
SEQ ID NO:207;
SEQ ID NO:211;
SEQ ID NO:215;
залишки 100-110 SEQ ID NO:334;
залишки 100-110 SEQ ID NO:336;
залишки 100-110 SEQ ID NO:338;

залишки 100-110 SEQ ID NO:340;
залишки 100-110 SEQ ID NO:342;
залишки 100-110 SEQ ID NO:344;
залишки 100-110 SEQ ID NO:346;
залишки 100-110 SEQ ID NO:348;
залишки 100-110 SEQ ID NO:350;
залишки 100-110 SEQ ID NO:352;
залишки 100-110 SEQ ID NO:354;
залишки 100-110 SEQ ID NO:356;
залишки 100-110 SEQ ID NO:358; i
залишки 100-110 SEQ ID NO:360;

CDR-L1, вибрана з групи, яка складається з:

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁ (SEQ ID NO:102), де:

X₁ являє собою S;

X₂ являє собою G;

X₃ являє собою Q, E або D;

X₄ являє собою R, S, G, M, K, L або T;

X₅ являє собою L;

X₆ являє собою G;

X₇ являє собою D або E;

X₈ являє собою K;

X₉ являє собою Y;

X₁₀ являє собою A або V; i

X₁₁ являє собою S;

залишки 23-33 SEQ ID NO:111;

SEQ ID NO:217;

SEQ ID NO:221;

SEQ ID NO:225;

SEQ ID NO:229;

SEQ ID NO:233;

SEQ ID NO:237;

SEQ ID NO:241;

SEQ ID NO:245;

SEQ ID NO:249;

SEQ ID NO:253;

SEQ ID NO:257;

SEQ ID NO:261;

SEQ ID NO:265;

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;

SEQ ID NO:301;

SEQ ID NO:305;

SEQ ID NO:309;

SEQ ID NO:313;

залишки 23-33 SEQ ID NO:335;

залишки 23-33 SEQ ID NO:337;
залишки 23-33 SEQ ID NO:339;
залишки 23-33 SEQ ID NO:341;
залишки 23-33 SEQ ID NO:343;
залишки 24-34 SEQ ID NO:345;
залишки 23-33 SEQ ID NO:347;
залишки 24-34 SEQ ID NO:349;
залишки 24-34 SEQ ID NO:351;
залишки 24-34 SEQ ID NO:353;
залишки 24-34 SEQ ID NO:355;
залишки 23-33 SEQ ID NO:357;
залишки 23-33 SEQ ID NO:359; i
залишки 23-33 SEQ ID NO:361;
CDR-L2, вибрана з групи, яка складається з:
X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (SEQ ID NO:103), де:
X₁ являє собою E або Q;
X₂ являє собою D;
X₃ являє собою S, L, T, A, E або F;
X₄ являє собою K, T, E, N, Q, S або M;
X₅ являє собою R;
X₆ являє собою P; i
X₇ являє собою S;
залишки 49-55 SEQ ID NO:111;
SEQ ID NO:230;
SEQ ID NO:234;
SEQ ID NO:238;
SEQ ID NO:242;
SEQ ID NO:246;
SEQ ID NO:250;
SEQ ID NO:254;
SEQ ID NO:258;
SEQ ID NO:262;
SEQ ID NO:266;
SEQ ID NO:270;
SEQ ID NO:218;
SEQ ID NO:222;
SEQ ID NO:226;
SEQ ID NO:274;
SEQ ID NO:278;
SEQ ID NO:302;
SEQ ID NO:294;
SEQ ID NO:282;
SEQ ID NO:290;
SEQ ID NO:298;
SEQ ID NO:286;
SEQ ID NO:306;
SEQ ID NO:310;
SEQ ID NO:314;
залишки 49-55 SEQ ID NO:335;
залишки 49-55 SEQ ID NO:337;
залишки 49-55 SEQ ID NO:339;

залишки 49-55 SEQ ID NO:341;
залишки 49-55 SEQ ID NO:343;
залишки 50-56 SEQ ID NO:345;
залишки 49-55 SEQ ID NO:347;
залишки 50-56 SEQ ID NO:349;
залишки 50-56 SEQ ID NO:351;
залишки 50-56 SEQ ID NO:353;
залишки 50-56 SEQ ID NO:355;
залишки 49-55 SEQ ID NO:357;
залишки 49-55 SEQ ID NO:359; і
залишки 49-55 SEQ ID NO:361;

і

CDR-L3, вибрана з групи, яка складається з:

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉ (SEQ ID NO:104), де:

X₁ являє собою Q;

X₂ являє собою A;

X₃ являє собою W;

X₄ являє собою D;

X₅ являє собою R, S, M, E, N, G або K;

X₆ являє собою D або E;

X₇ являє собою T, V, A, S або M;

X₈ являє собою G, A або C; і

X₉ являє собою V;

залишки 88-96 SEQ ID NO:111;

SEQ ID NO:231;

SEQ ID NO:235;

SEQ ID NO:239;

SEQ ID NO:243;

SEQ ID NO:247;

SEQ ID NO:251;

SEQ ID NO:255;

SEQ ID NO:259;

SEQ ID NO:263;

SEQ ID NO:267;

SEQ ID NO:271;

SEQ ID NO:219;

SEQ ID NO:223;

SEQ ID NO:227;

SEQ ID NO:275;

SEQ ID NO:279;

SEQ ID NO:303;

SEQ ID NO:295;

SEQ ID NO:283;

SEQ ID NO:291;

SEQ ID NO:299;

SEQ ID NO:287;

SEQ ID NO:307;

SEQ ID NO:311;

SEQ ID NO:315;

залишки 88-96 SEQ ID NO:335;

залишки 88-96 SEQ ID NO:337;

залишки 88-96 SEQ ID NO:339;
залишки 88-96 SEQ ID NO:341;
залишки 88-96 SEQ ID NO:343;
залишки 89-97 SEQ ID NO:345;
залишки 88-96 SEQ ID NO:347;
залишки 89-97 SEQ ID NO:349;
залишки 89-97 SEQ ID NO:351;
залишки 89-97 SEQ ID NO:353;
залишки 89-97 SEQ ID NO:355;
залишки 88-96 SEQ ID NO:357;
залишки 88-96 SEQ ID NO:359; і
залишки 88-96 SEQ ID NO:361.

2. Зв'язувальний білок за п. 1, де щонайменше одна вказана CDR містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

залишків 31-37 SEQ ID NO:1 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO:1 (CDR-H2); залишків 100-110 SEQ ID NO:1 (CDR-H3);

залишків 23-33 SEQ ID NO:111 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO:111 (CDR-L2);
залишків 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: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: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: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: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: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 (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);

[illegible]

залишків 89-97 SEQ ID NO:353 (CDR-L3);
залишків 31-37 SEQ ID NO:354 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO:354 (CDR-H2);
залишків 100-110 SEQ ID NO:354 (CDR-H3);
залишків 24-34 SEQ ID NO:355 (CDR-L1); залишків 50-56 SEQ ID NO:355 (CDR-L2);
залишків 89-97 SEQ ID NO:355 (CDR-L3);
залишків 31-37 SEQ ID NO:356 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO:356 (CDR-H2);
залишків 100-110 SEQ ID NO:356 (CDR-H3);
залишків 23-33 SEQ ID NO:357 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO:357 (CDR-L2);
залишків 88-96 SEQ ID NO:357 (CDR-L3);
залишків 31-37 SEQ ID NO:358 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO:358 (CDR-H2);
залишків 100-110 SEQ ID NO:358 (CDR-H3);
залишків 23-33 SEQ ID NO:359 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO:359 (CDR-L2);
залишків 88-96 SEQ ID NO:359 (CDR-L3);
залишків 31-37 SEQ ID NO:360 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO:360 (CDR-H2);
залишків 100-110 SEQ ID NO:360 (CDR-H3);
залишків 23-33 SEQ ID NO:361 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO:361 (CDR-L2);
залишків 88-96 SEQ ID NO:361 (CDR-L3).

3. Зв'язувальний білок за п. 1 або п. 2, де вказаний зв'язувальний білок містить щонайменше 3 CDR, вибрані з групи наборів CDR варіабельного домену, що складаються з:

набору VH E9 CDR

CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO:1,

CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO:1,

CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO:1;

набору VL E9 CDR

CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO:111,

CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO:111,

CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO:111;

набору VH E9.4 CDR

CDR-H1: SEQ ID NO:117,

CDR-H2: SEQ ID NO:118,

CDR-H3: SEQ ID NO:119;

набору VL E9.4 CDR

CDR-L1: SEQ ID NO:229,

CDR-L2: SEQ ID NO:230,

CDR-L3: SEQ ID NO:231;

набору VH E9.11 CDR

CDR-H1: SEQ ID NO:121,

CDR-H2: SEQ ID NO:122,

CDR-H3: SEQ ID NO:123;

набору VL E9.11 CDR

CDR-L1: SEQ ID NO:233,

CDR-L2: SEQ ID NO:234,

CDR-L3: SEQ ID NO:235;

набору VH E9.14 CDR

CDR-H1: SEQ ID NO:125,

CDR-H2: SEQ ID NO:126,

CDR-H3: SEQ ID NO:127;

набору VL E9.14 CDR

CDR-L1: SEQ ID NO:237,

CDR-L2: SEQ ID NO:238,

CDR-L3: SEQ ID NO:239;

набору VH E9.17 CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:129,
CDR-H2: SEQ ID NO:130,
CDR-H3: SEQ ID NO:131;
набору VL E9.17 CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:241,
CDR-L2: SEQ ID NO:242,
CDR-L3: SEQ ID NO:243;
набору VH E9.18 CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:133,
CDR-H2: SEQ ID NO:134,
CDR-H3: SEQ ID NO:135;
набору VL E9.18 CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:245,
CDR-L2: SEQ ID NO:246,
CDR-L3: SEQ ID NO:247;
набору VH E9.19 CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:137,
CDR-H2: SEQ ID NO:138,
CDR-H3: SEQ ID NO:139;
набору VL E9.19 CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:249,
CDR-L2: SEQ ID NO:250,
CDR-L3: SEQ ID NO:251;
набору VH E9.22 CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:141,
CDR-H2: SEQ ID NO:142,
CDR-H3: SEQ ID NO:143;
набору VL E9.22 CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:253,
CDR-L2: SEQ ID NO:254,
CDR-L3: SEQ ID NO:255;
набору VH E9.48 CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:145,
CDR-H2: SEQ ID NO:146,
CDR-H3: SEQ ID NO:147;
набору VL E9.48 CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:257,
CDR-L2: SEQ ID NO:258,
CDR-L3: SEQ ID NO:259;
набору VH E9.65 CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:149,
CDR-H2: SEQ ID NO:150,
CDR-H3: SEQ ID NO:151;
набору VL E9.65 CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:261,
CDR-L2: SEQ ID NO:262,
CDR-L3: SEQ ID NO:263;
набору VH E9.66 CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:153,
CDR-H2: SEQ ID NO:154,

CDR-H3: SEQ ID NO:155;
набору VL E9.66 CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:265,
CDR-L2: SEQ ID NO:266,
CDR-L3: SEQ ID NO:267;
набору VH E9.71 CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:157,
CDR-H2: SEQ ID NO:158,
CDR-H3: SEQ ID NO:159;
набору VL E9.71 CDR
CDR-L1:SEQ ID NO:269,
CDR-L2: SEQ ID NO:270,
CDR-L3:SEQ ID NO:271;
набору VH E9.13 CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:161,
CDR-H2: SEQ ID NO:162,
CDR-H3: SEQ ID NO:163;
набору VL E9.13 CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:217,
CDR-L2:SEQ ID NO:218,
CDR-L3:SEQ ID NO:219;
набору VH E9.16 CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:165,
CDR-H2: SEQ ID NO:166,
CDR-H3: SEQ ID NO:167;
набору VL E9.16 CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:221,
CDR-L2: SEQ ID NO:222,
CDR-L3: SEQ ID NO:223;
набору VH E9.38 CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:169,
CDR-H2: SEQ ID NO:170,
CDR-H3: SEQ ID NO:171;
набору VL E9.38 CDR
CDR-L1:SEQ ID NO:225,
CDR-L2: SEQ ID NO:226,
CDR-L3: SEQ ID NO:227;
набору VH E9.2B CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:173,
CDR-H2: SEQ ID NO:174,
CDR-H3: SEQ ID NO:175;
набору VL E9.2B CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:273,
CDR-L2: SEQ ID NO:274,
CDR-L3: SEQ ID NO:275;
набору VH E9.1F CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:177,
CDR-H2: SEQ ID NO:178,
CDR-H3: SEQ ID NO:179;
набору VL E9.1F CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:277,

CDR-L2: SEQ ID NO:278,
CDR-L3: SEQ ID NO:279;
набору VH E9.10H CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:181,
CDR-H2: SEQ ID NO:182,
CDR-H3: SEQ ID NO:183;
набору VL E9.10H CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:301,
CDR-L2: SEQ ID NO:302,
CDR-L3: SEQ ID NO:303;
набору VH E9.5E CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:185,
CDR-H2: SEQ ID NO:186,
CDR-H3: SEQ ID NO:187;
набору VL E9.5E CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:293,
CDR-L2: SEQ ID NO:294,
CDR-L3: SEQ ID NO:295;
набору VH E9.10C CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:189,
CDR-H2: SEQ ID NO:190,
CDR-H3: SEQ ID NO:191;
набору VL E9.10C CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:281,
CDR-L2: SEQ ID NO:282,
CDR-L3: SEQ ID NO:283;
набору VH E9.7E CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:193,
CDR-H2: SEQ ID NO:194,
CDR-H3: SEQ ID NO:195;
набору VL E9.7E CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:289,
CDR-L2: SEQ ID NO:290,
CDR-L3: SEQ ID NO:291;
набору VH E9.12B CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:197,
CDR-H2: SEQ ID NO:198,
CDR-H3: SEQ ID NO:199;
набору VL E9.12B CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:297,
CDR-L2: SEQ ID NO:298,
CDR-L3: SEQ ID NO:299;
набору VH E9.10E CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:201,
CDR-H2: SEQ ID NO:202,
CDR-H3: SEQ ID NO:203;
набору VL E9.10E CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:285,
CDR-L2: SEQ ID NO:286,
CDR-L3: SEQ ID NO:287;
набору VH E9.6A CDR

CDR-H1: SEQ ID NO:205,
CDR-H2: SEQ ID NO:206,
CDR-H3: SEQ ID NO:207;
набору VL E9.6A CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:305,
CDR-L2: SEQ ID NO:306,
CDR-L3: SEQ ID NO:307;
набору VH E9.7A CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:209,
CDR-H2: SEQ ID NO:210,
CDR-H3: SEQ ID NO:211;
набору VL E9.7A CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:309,
CDR-L2: SEQ ID NO:310,
CDR-L3: SEQ ID NO:311;
набору VH E9.8H CDR
CDR-H1: SEQ ID NO:213,
CDR-H2: SEQ ID NO:214,
CDR-H3: SEQ ID NO:215;
набору VL E9.8H CDR
CDR-L1: SEQ ID NO:313,
CDR-L2: SEQ ID NO:314,
CDR-L3: SEQ ID NO:315;
набору VH E9.1 CDR
CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO:334,
CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO:334,
CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO:334;
набору VL E9.1 CDR
CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO:335,
CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO:335,
CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO:335;
набору VH E9-SE1 CDR
CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO:336,
CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO:336,
CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO:336;
набору VL E9-SE1 CDR
CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO:337,
CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO:337,
CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO:337;
набору VH E9-SE2 CDR
CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO:338,
CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO:338,
CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO:338;
набору VL E9-SE2 CDR
CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO:339,
CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO:339,
CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO:339;
набору VH E9-SE3 CDR
CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO:340,
CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO:340,
CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO:340;

набору VL E9-SE3 CDR

CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO:341,

CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO:341,

CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO:341;

набору VH E9-SE4 CDR

CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO:342,

CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO:342,

CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO:342;

набору VL E9-SE4 CDR

CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO:343,

CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO:343,

CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO:343;

набору VH E9-SE5 CDR

CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO:344,

CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO:344,

CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO:344;

набору VL E9-SE5 CDR

CDR-L1: залишки 24-34 SEQ ID NO:345,

CDR-L2: залишки 50-56 SEQ ID NO:345,

CDR-L3: залишки 89-97 SEQ ID NO:345;

набору VH E9-SE6 CDR

CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO:346,

CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO:346,

CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO:346;

набору VL E9-SE6 CDR

CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO:347,

CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO:347,

CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO:347;

набору VH E9-SE7 CDR

CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO:348,

CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO:348,

CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO:348;

набору VL E9-SE7 CDR

CDR-L1: залишки 24-34 SEQ ID NO:349,

CDR-L2: залишки 50-56 SEQ ID NO:349,

CDR-L3: залишки 89-97 SEQ ID NO:349;

набору VH E9-SE8 CDR

CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO:350,

CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO:350,

CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO:350;

набору VL E9-SE8 CDR

CDR-L1: залишки 24-34 SEQ ID NO:351,

CDR-L2: залишки 50-56 SEQ ID NO:351,

CDR-L3: залишки 89-97 SEQ ID NO:351;

набору VH E9-FR1 CDR

CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO:352,

CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO:352,

CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO:352;

набору VL E9-FR1 CDR

CDR-L1: залишки 24-34 SEQ ID NO:353,

CDR-L2: залишки 50-56 SEQ ID NO:353,

CDR-L3: залишки 89-97 SEQ ID NO:353;
набору VH E9-FR2 CDR
CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO:354,
CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO:354,
CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO:354;
набору VL E9-FR2 CDR
CDR-L1: залишки 24-34 SEQ ID NO:355,
CDR-L2: залишки 50-56 SEQ ID NO:355,
CDR-L3: залишки 89-97 SEQ ID NO:355;
набору VH E9.71 CDR
CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO:356,
CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO:356,
CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO:356;
набору VL E9.71 CDR
CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO:357,
CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO:357,
CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO:357;
набору VH E9.71(M) CDR
CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO:358,
CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO:358,
CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO:358;
набору VL E9.71(M) CDR
CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO:359,
CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO:359,
CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO:359;
набору VH E9.71(L) CDR
CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO:360,
CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO:360,
CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO:360;
набору VL E9.71(L) CDR
CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO:361,
CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO:361,
CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO:361.

4. Зв'язувальний білок за п. 3, який містить щонайменше два набори CDR варіабельних доменів.

5. Зв'язувальний білок за п. 4, де вказані щонайменше два набори CDR варіабельних доменів вибрані з групи, що складається з:

набору VH E9 CDR і набору VL E9 CDR,
набору VH E9.4 CDR і набору VL E9.4 CDR,
набору VH E9.11 CDR і набору VL E9.11 CDR,
набору VH E9.14 CDR і набору VL E9.14 CDR,
набору VH E9.17 CDR і набору VL E9.17 CDR,
набору VH E9.18 CDR і набору VL E9.18 CDR,
набору VH E9.19 CDR і набору VL E9.19 CDR,
набору VH E9.22 CDR і набору VL E9.22 CDR,
набору VH E9.48 CDR і набору VL E9.48 CDR,
набору VH E9.65 CDR і набору VL E9.65 CDR,
набору VH E9.66 CDR і набору VL E9.66 CDR,
набору VH E9.71 CDR і набору VL E9.71 CDR,
набору VH E9.13 CDR і набору VL E9.13 CDR,
набору VH E9.16 CDR і набору VL E9.16 CDR,

набору VH E9.38 CDR і набору VL E9.38 CDR,
набору VH E9.2B CDR і набору VL E9.2B CDR,
набору VH E9.1F CDR і набору VL E9.1F CDR,
набору VH E9.10H CDR і набору VL E9.10H CDR,
набору VH E9.5E CDR і набору VL E9.5E CDR,
набору VH E9.10C CDR і набору VL E9.10C CDR,
набору VH E9.7E CDR і набору VL E9.7E CDR,
набору VH E9.12B CDR і набору VL E9.12B CDR,
набору VH E9.10E CDR і набору VL E9.10E CDR,
набору VH E9.6A CDR і набору VL E9.6A CDR,
набору VH E9.7A CDR і набору VL E9.7A CDR,
набору VH E9.8H CDR і набору VL E9.8H CDR,
набору VH E9-SE1 CDR і набору VL E9-SE1 CDR,
набору VH E9-SE2 CDR і набору VL E9-SE2 CDR,
набору VH E9-SE3 CDR і набору VL E9-SE3 CDR,
набору VH E9-SE4 CDR і набору VL E9-SE4 CDR,
набору VH E9-SE5 CDR і набору VL E9-SE5 CDR,
набору VH E9-SE6 CDR і набору VL E9-SE6 CDR,
набору VH E9-SE7 CDR і набору VL E9-SE7 CDR,
набору VH E9-SE8 CDR і набору VL E9-SE8 CDR,
набору VH E9-FR1 CDR і набору VL E9-FR1 CDR,
набору VH E9-FR2 CDR і набору VL E9-FR2 CDR,
набору VH E9.71 CDR і набору VL E9.71 CDR,
набору VH E9.71(M) CDR і набору VL E9.71(M) CDR, і
набору VH E9.71(L) CDR і набору VL E9.71(L) CDR.

6. Зв'язувальний білок за будь-яким з пп. 1-5, який також містить людську акцепторну каркасну область.

7. Зв'язувальний білок за п. 6, де вказана людська акцепторна каркасна область містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

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, і SEQ ID NO:98.

8. Зв'язувальний білок за п. 7, де вказана людська акцепторна каркасна область містить щонайменше одну амінокислотну заміну в каркасній області в положенні ключового залишку, де вказаний ключовий залишок вибраний з групи, що складається з:

залишку, суміжного з CDR;

залишку сайту глікозилювання;

рідкого залишку;

залишку, здатного взаємодіяти з людським DLL4;

канонічного залишку;

залишку зони контактування варіабельної області важкого ланцюга з варіабельною областю легкого ланцюга;

залишку в зоні Верньєра; і

залишку в області, яка перекривається з областю CDR1 варіабельного важкого ланцюга, визначеною по Чотіа, і з першою каркасною областю важкого ланцюга, визначеною по Кебату.

9. Зв'язувальний білок за п. 8, де вказаний ключовий залишок вибраний з групи, що складається з: 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, 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 і 95L.

10. Зв'язувальний білок за будь-яким з пп. 1-9, де вказаний зв'язувальний білок містить щонайменше один варіабельний домен, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з 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 і 361.

11. Зв'язувальний білок за п. 10, де вказаний зв'язувальний білок містить два варіабельних домени, де вказані два варіабельних домени мають амінокислотні послідовності, вибрані з групи, що складається з SEQ ID NO:1 і 111, SEQ ID NO:116 і 228, SEQ ID NO:120 і 232, SEQ ID NO:124 і 236, SEQ ID NO:128 і 240, SEQ ID NO:132 і 244, SEQ ID NO:136 і 248, SEQ ID NO:140 і 252, SEQ ID NO:144 і 256, SEQ ID NO:148 і 260, SEQ ID NO:152 і 264, SEQ ID NO:156 і 268, SEQ ID NO:160 і 216, SEQ ID NO:164 і 220, SEQ ID NO:168 і 224, SEQ ID NO:172 і 272, SEQ ID NO:176 і 276, SEQ ID NO:180 і 300, SEQ ID NO:184 і 292, SEQ ID NO:188 і 280, SEQ ID NO:192 і 288, SEQ ID NO:196 і 296, SEQ ID NO:200 і 284, SEQ ID NO:204 і 304, SEQ ID NO:208 і 308, SEQ ID NO:212 і 312, SEQ ID NO:334 і 335, SEQ ID NO:336 і 337, SEQ ID NO:338 і 339, SEQ ID NO:340 і 341, SEQ ID NO:342 і 343, SEQ ID NO:344 і 345, SEQ ID NO:346 і 347, SEQ ID NO:348 і 349, SEQ ID NO:350 і 351, SEQ ID NO:352 і 353, SEQ ID NO:354 і 355, SEQ ID NO:356 і 357, SEQ ID NO:358 і 359, SEQ ID NO:360 і 361.

12. Зв'язувальний білок за п. 10, де вказаний зв'язувальний білок містить щонайменше один варіабельний домен, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з 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 і 361.

13. Зв'язувальний білок за п. 1, який також містить константний домен важкого ланцюга імуноглобуліну, вибраний з групи, що складається з константного домену людського IgM, константного домену людського IgG1, константного домену людського IgG2, константного

домену людського IgG3, константного домену людського IgG4, константного домену людського IgE і константного домену людського IgA.

14. Зв'язувальний білок за п. 13, де вказаний константний домен важкого ланцюга імуноглобуліну являє собою константний домен людського IgG1, при цьому вказаний константний домен людського IgG1 містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:2 і SEQ ID NO:3.

15. Зв'язувальний білок за п. 1, який додатково містить константний домен легкого ланцюга імуноглобуліну, де вказаний константний домен легкого ланцюга імуноглобуліну являє собою константний домен Ig каппа людини, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4.

16. Зв'язувальний білок за п. 1, який додатково містить константний домен легкого ланцюга імуноглобуліну, де вказаний константний домен легкого ланцюга імуноглобуліну являє собою константний домен Ig лямбда людини, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5.

17. Зв'язувальний білок за п. 1, де вказаний зв'язувальний білок вибраний з групи, що складається з молекули імуноглобуліну, scFv, моноклонального антитіла, людського антитіла, химерного антитіла, гуманізованого антитіла, однодоменного антитіла, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, Fv-фрагмента, Fv, зв'язаного дисульфідним зв'язком, однодоменного антитіла, діантитіла, мультиспецифічного антитіла, біспецифічного антитіла і антитіла з подвійною специфічністю.

18. Зв'язувальний білок за п. 17, де вказаним зв'язувальним білком є людське антитіло.

19. Зв'язувальний білок, який має здатність зв'язуватися з людським DLL - 4, де вказаний зв'язувальний білок містить:

константну область важкого ланцюга Ig, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:2 і SEQ ID NO:3;

константну область легкого ланцюга Ig, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:4 і SEQ ID NO:5;

варіабельну область важкого ланцюга Ig, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

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 і 360; і

варіабельну область легкого ланцюга Ig, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

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 і 361.

20. Зв'язувальний білок за п. 19, де вказаною константною областю легкого ланцюга Ig є SEQ ID NO:5.

21. Зв'язувальний білок за будь-яким з пп. 1-20, де вказаний зв'язувальний білок має здатність блокувати взаємодію DLL4 з білком Notch, вибраним з групи, що складається з Notch-1, Notch-2, Notch-3, Notch-4 і їх комбінацій.

22. Зв'язувальний білок за п. 21, де вказаний зв'язувальний білок має здатність блокувати взаємодію DLL4 з Notch-1 і Notch-4.

23. Зв'язувальний білок за будь-яким з пп. 1-22, де вказаний зв'язувальний білок має здатність модулювати біологічну функцію DLL4.

24. Зв'язувальний білок за будь-яким з пп. 1-23, де вказаний зв'язувальний білок має здатність нейтралізувати DLL4.

25. Нейтралізуючий зв'язувальний білок за п. 24, де вказаний DLL4 вибраний з групи, що складається з людського DLL4, мишачого DLL4, DLL4 яванського макака і щурячого DLL4.

26. Модулюючий зв'язувальний білок за п. 23, де вказаний модулюючий зв'язувальний білок

має здатність знижувати нормальний ангіогенез.

27. Нейтралізуючий зв'язувальний білок за п. 24, де вказаний нейтралізуючий зв'язувальний білок має константу дисоціації (K_D), вибрану з групи, що складається з: приблизно максимум 10^{-7} М; приблизно максимум 10^{-8} М; приблизно максимум 10^{-9} М; приблизно максимум 10^{-10} М; приблизно максимум 10^{-11} М; приблизно максимум 10^{-12} М і максимум 10^{-13} М.

28. Нейтралізуючий зв'язувальний білок за п. 24, де вказаний нейтралізуючий зв'язувальний білок має швидкість асоціації, вибрану з групи, що складається з: щонайменше приблизно 10^2 $M^{-1}s^{-1}$; щонайменше приблизно 10^3 $M^{-1}s^{-1}$; щонайменше приблизно 10^4 $M^{-1}s^{-1}$; щонайменше приблизно 10^5 $M^{-1}s^{-1}$ і щонайменше приблизно 10^6 $M^{-1}s^{-1}$.

29. Нейтралізуючий зв'язувальний білок за п. 24, де вказаний нейтралізуючий зв'язувальний білок має швидкість дисоціації, вибрану з групи, що складається з: приблизно максимум 10^{-3} s^{-1} ; приблизно максимум 10^{-4} s^{-1} ; приблизно максимум 10^{-5} s^{-1} і приблизно максимум 10^{-6} s^{-1} .

30. Мічений зв'язувальний білок, що містить зв'язувальний білок за п. 17, де вказаний зв'язувальний білок кон'югований з детектованою міткою.

31. Конструкція антитіла, яка містить зв'язувальний білок за п. 1, а також поліпептидний лінкер або константний домен імуноглобуліну.

32. Конструкція антитіла за п. 31, вибрана з групи, що складається з:

молекул імуноглобуліну,

моноклонального антитіла,

химерного антитіла,

CDR-прищепленого антитіла,

гуманізованого антитіла,

Fab,

Fab',

F(ab')₂,

Fv,

Fv, зв'язаного дисульфідним зв'язком,

scFv,

однодоменного антитіла,

діантитіла,

мультиспецифічного антитіла,

антитіла з подвійною специфічністю і біспецифічного антитіла.

33. Конструкція антитіла за п. 31, де вказана конструкція антитіла включає константний домен важкого ланцюга імуноглобуліну, вибраний з групи, що складається з:

константного домену людського IgM,

константного домену людського IgG1,

константного домену людського IgG2,

константного домену людського IgG3,

константного домену людського IgG4,

константного домену людського IgE,

константного домену людського IgA і

варіанта константного домену IgG з однією або декількома мутаціями, що змінюють силу зв'язування з неонатальним Fc-рецептором, рецепторами Fc-гамма або C1q.

34. Кон'югат антитіла, який містить конструкцію антитіла за п. 31, де вказана конструкція антитіла кон'югована з терапевтичним або цитотоксичним засобом.

35. Кон'югат антитіла за п. 34, де вказаний терапевтичний або цитотоксичний засіб вибраний з групи, що складається з антиметаболіту, алкілувального агента, антибіотика, фактора росту, цитокіну, антиангіогенного агента, антимітотичного засобу, антрацикліну, токсину і апоптотичного агента.

36. Ізольована нуклеїнова кислота, яка кодує поліпептид, вибраний з групи, що складається з: поліпептиду, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, де вказаний варіабельний

домен важкого ланцюга включає одну або декілька з CDR-H1, CDR-H2 або CDR-H3 за п. 1; поліпептиду, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, де вказаний варіабельний домен легкого ланцюга включає одну або декілька з CDR-L1, CDR-L2 або CDR-L3 за п. 1; або комбінації обох поліпептидів.

37. Вектор, який містить ізольовану нуклеїнову кислоту за п. 36.

38. Клітина-хазяїн, яка містить вектор за п. 37.

39. Клітина-хазяїн за п. 38, де вказана клітина-хазяїн є еукаріотичною клітиною, вибраною з групи, що складається з клітини протистів, клітини тварини, клітини рослини і клітини грибів.

40. Клітина-хазяїн за п. 39, де вказаною еукаріотичною клітиною є клітина тварини, вибрана з групи, що складається з клітини ссавця, клітини птахів і клітини комах.

41. Клітина-хазяїн за п. 39, де вказаною клітиною-хазяїном є клітина CHO, клітина COS, клітина Sf9 або дріжджова клітина.

42. Спосіб одержання зв'язувального білка, який зв'язується з людським DLL4, де вказаний спосіб включає культивування клітини-хазяїна за п. 38 в культуральному середовищі в умовах, достатніх для продукування зв'язувального білка, який зв'язується з людським DLL4.

43. Зв'язувальний білок, одержаний способом за п. 42.

44. Кристалізований зв'язувальний білок, який включає зв'язувальний білок за п. 1, де вказаний зв'язувальний білок присутній у вигляді кристала.

45. Фармацевтична композиція, яка містить зв'язувальний білок за п. 1 і фармацевтично прийнятний носій.

46. Фармацевтична композиція за п. 45, яка також включає щонайменше один додатковий терапевтичний засіб для лікування розладу, асоційованого з негативною активністю DLL4.

47. Фармацевтична композиція за п. 46, де вказаний додатковий засіб вибраний з групи, що складається з інгібітору ангіогенезу; інгібіторів кінази; блокаторів костимулюючої молекули; блокаторів адгезивної молекули; антитіла проти цитокіну або його функціонального фрагмента; метотрексату; кортикостероїдів; циклоспорину; рапаміцину; FK506 і нестероїдних протизапальних засобів.

48. Спосіб зниження активності людського DLL4, який включає контактування людського DLL4 зі зв'язувальним білком за будь-яким з пп. 1-35, яке приводить до зниження DLL4-активності.

49. Спосіб зниження активності людського DLL4 у людини, страждаючої розладом, асоційованим з негативною активністю DLL4, де вказаний спосіб включає введення вказаному індивідууму зв'язувального білка за будь-яким з пп. 1-35, яке приводить до зниження активності DLL4 у людини.

50. Спосіб за п. 49, де вказаний розлад вибраний з групи, що складається з раку молочної залози, раку товстої кишки, раку прямої кишки, раку легень, раку ротоглотки, раку гортані, раку стравоходу, раку шлунка, раку підшлункової залози, раку печінки, раку жовчного міхура, раку жовчних проток, раку тонкого кишечника, раку сечових шляхів, раку жіночих статевих органів, раку чоловічих статевих органів, раку ендокринних залоз, раку шкіри, гемангіоми, меланоми, саркоми, пухлини головного мозку, раку нервових тканин, раку очей, раку мозкової оболонки, солідних пухлин, що походять від гемопоетичних злоякісних пухлин, метастазів пухлин, очної неоваскуляризації, набряків, ревматоїдного артрити, розсіяного склерозу, атеросклеротичних бляшок, хвороби Крона, запального захворювання кишечника, асцити, що важко піддається лікуванню, псоріазу, саркоїдозу, артеріосклерозу, сепсису, пептичних виразок, опіків, панкреатиту, полікістозу яєчника (ПКЯ), ендометріозу, фіброми матки, злоякісної гіпертрофії передміхурової залози і інших асоційованих і не асоційованих з ангіогенезом захворювань, що характеризуються аберантною активністю DLL4.

51. Спосіб лікування пацієнта, страждаючого розладом, асоційованим з негативним впливом DLL4, де вказаний спосіб включає стадію введення зв'язувального білка за будь-яким з пп. 1-

35 до, під час або після введення другого агента, де вказаний другий агент вибраний з групи, що складається з антитіла або його фрагмента, що має здатність зв'язуватися з людським VEGFR2; метотрексату, антитіла або його фрагмента, що має здатність зв'язуватися з людським TNF; кортикостероїдів; циклоспорину; рапаміцину; FK506 і нестероїдних протизапальних засобів.

52. Зв'язувальний білок, здатний зв'язуватися з людським DLL4, де вказаний зв'язувальний білок містить антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, при цьому антитіло або антигензв'язувальний фрагмент містять: варіабельний домен важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:156, варіабельний домен легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:268.

53. Зв'язувальний білок за п. 52, який додатково містить константний домен важкого ланцюга імуноглобуліну, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:2 і SEQ ID NO:3, і константний домен легкого ланцюга імуноглобуліну, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:4 і SEQ ID NO:5.

54. Зв'язувальний білок, здатний зв'язуватися з людським DLL4, де вказаний зв'язувальний білок містить антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, при цьому антитіло або антигензв'язувальний фрагмент містять: варіабельний домен важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:360, варіабельний домен легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:361.

55. Зв'язувальний білок за п. 54, який додатково містить константний домен важкого ланцюга імуноглобуліну, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:2 і SEQ ID NO:3, і константний домен легкого ланцюга імуноглобуліну, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:4 і SEQ ID NO:5.

56. Зв'язувальний білок, здатний зв'язуватися з людським DLL4, де вказаний зв'язувальний білок містить антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, при цьому антитіло або антигензв'язувальний фрагмент містять: варіабельний домен важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:156, варіабельний домен легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:359.

57. Зв'язувальний білок за п. 56, який додатково містить константний домен важкого ланцюга імуноглобуліну, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:2 і SEQ ID NO:3, і константний домен легкого ланцюга імуноглобуліну, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:4 і SEQ ID NO:5.

58. Зв'язувальний білок за пп. 53, 55 або 57, який додатково містить сигнальний пептид легкого ланцюга, при цьому зазначений сигнальний пептид легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:365.

Посилання на споріднені заявки

У даній заявці вимагається пріоритет попередньої заявки на патент США № 61/238152, поданої 29 серпня 2009 р., і попередньої заявки на патент США № 61/261728, поданої 16 листопада 2009 р.

Галузь, до якої належить винахід

Даний винахід стосується одержання і застосування DLL4-зв'язувальних білків з поліпшеними властивостями, і їх використання для пригнічення, попередження і/або лікування ракових захворювань, пухлин і/або інших асоційованих з ангіогенезом захворювань, таких як очна неоваскуляризація, або захворювань, які не асоційовані з ангіогенезом і характеризуються порушенням експресії або активності DLL4, таких як аутоімунні розлади.

Попередній рівень техніки

Міжклітинні взаємодії необхідні для здійснення множини біологічних процесів, таких як диференціювання, проліферація і гомеостаз. Однією з систем, використовуваних еукаріотами широкого ряду, є шлях передачі сигналу Notch. Цей шлях, зокрема рецептор Notch, також грає важливу роль в функціональному ангіогенезі пухлини. Таким чином, інгібування функції рецептора Notch, блокування рецептора Notch і/або блокування шляху передачі Notch-сигналу є стратегією, яка може бути застосована для одержання протиракових композицій і розробки методів лікування раку. Було встановлено, що невеликі молекули-інгібітори рецептора Notch є токсичними, оскільки вони пригнічують експресію рецептора Notch в тканинах дикого типу (нормальних тканинах) у всьому організмі. Таким чином, різні члени шляху передачі сигналу Notch повинні розглядатися як потенційні мішені для терапії.

Лігандом судинної мережі для рецептора Notch є дельта-4 або дельта-подібний ліганд 4 (DLL4). DLL4, який експресується, головним чином, в судинній мережі, грає важливу роль в розвитку судин (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)). Миші, гетерозиготні по DLL4, гинуть на стадії ембріонального розвитку, що зумовлено значними порушеннями розвитку судин (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)). Експресія DLL4 може бути індукована 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 чергу, DLL4 може знижувати передачу сигналу VEGF, частково за допомогою інгібування VEGFR2 і індукції VEGFR1 (Harrington et al., Microvasc. Res., 75(2): 144-154 (2008); Suchting et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104(9): 3225-3230 (2007)). Тонка координація між DLL4 і VEGF грає важливу роль в функціональному ангіогенезі.

Крім своєї фізіологічної ролі DLL4 також активується в кровоносних судинах пухлин (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)). Блокування DLL4 приводить до сильного інгібування росту первинної пухлини в багатьох моделях (Noguera-Troise et al., Nature, 444(7122): 1032-1037 (2006); Ridgway et al., Nature, 444(7122): 1083-1087 (2006); Sclafani et al., Blood, 109(11): 4753-4760 (2007)). Таке інгібування DLL4 є ефективним навіть стосовно пухлин, резистентних до терапії анти-VEGF антитілами. Комбіноване інгібування DLL4 і VEGF приводить до підвищення протипухлинної активності. Цікаво зазначити, що на відміну від інгібування VEGF, яке знижує утворення пухлинних судин, блокування DLL4 приводить до підвищення щільності судинної мережі пухлини, де вказані судини є аномальними, не можуть забезпечувати ефективне проходження кровотоку і є функціонально неефективними. Таким чином, DLL4 є потенційною мішенню для лікування раку.

Тому необхідно одержати такі терапевтичні засоби, які можуть бути націлені на шлях DLL4-Notch і тим самим інгібувати цей шлях або навіть запобігати ангіогенезу і росту пухлини.

Опис суті винаходу

Даний винахід стосується білків, які зв'язуються з DLL4, включаючи антитіла, CDR-прищеплені антитіла і їх зв'язувальні фрагменти, що мають здатність зв'язуватися з DLL4. Описаний тут зв'язувальний білок, переважно, зв'язується з DLL4 з високою афінністю. Більш переважно, зв'язувальний білок згідно з винаходом має здатність нейтралізувати DLL4. Даний винахід також стосується способів одержання і застосування DLL4-зв'язувальних білків, включаючи людські DLL4-зв'язувальні білки. Перевага даного винаходу полягає в тому, що він не вимагає одержання гуманізованих DLL4-зв'язувальних білків, що дозволяє уникнути проблем, виникаючих при використанні гуманізованих DLL4-зв'язувальних білків.

У одному зі своїх аспектів даний винахід стосується зв'язувального білка, що містить антигензв'язувальний домен, здатний зв'язуватися з людським DLL4, де вказаний антигензв'язувальний домен включає щонайменше одну або декілька CDR, вибраних з групи, що складається з:

CDR-H1: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (SEQ ID NO: 99), де:

X_1 являє собою S або N;
 X_2 являє собою S, G або N;
 X_3 являє собою S, N, T, G або R;
 X_4 являє собою Y;
 X_5 являє собою Y або H;
 X_6 являє собою W; i
 X_7 являє собою G;
 CDR-H2: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} (SEQ ID NO: 100), де:
 X_1 являє собою D;
 X_2 являє собою I;
 X_3 являє собою Y, N або S;
 X_4 являє собою Y;
 X_5 являє собою T, N, A, I, S або R;
 X_6 являє собою G;
 X_7 являє собою S, N, T або G;
 X_8 являє собою T;
 X_9 являє собою Y;
 X_{10} являє собою Y;
 X_{11} являє собою N;
 X_{12} являє собою P;
 X_{13} являє собою S;
 X_{14} являє собою L;
 X_{15} являє собою K; i
 X_{16} являє собою S, N, D або G;
 CDR-H3: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} (SEQ ID NO: 101), де:
 X_1 являє собою E, Y, F, Q, W, L або A;
 X_2 являє собою D, A, S, G, V, E або N;
 X_3 являє собою V, M, L, P або A;
 X_4 являє собою I, A, P, R, S, K, Q, V, G, M або E;
 X_5 являє собою L, Y, F або M;
 X_6 являє собою R, G, S, Q або A;
 X_7 являє собою G;
 X_8 являє собою G, A або S;
 X_9 являє собою S, A, L, V, R або G;
 X_{10} являє собою D; i
 X_{11} являє собою Y, D, S, N, H, E, R, L, P, C, I, M, T, Q або K;
 CDR-L1: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} (SEQ ID NO: 102), де:
 X_1 являє собою S;
 X_2 являє собою G;
 X_3 являє собою Q, E або D;
 X_4 являє собою R, S, G, M, K, L або T;
 X_5 являє собою L;
 X_6 являє собою G;
 X_7 являє собою D або E;
 X_8 являє собою K;
 X_9 являє собою Y;
 X_{10} являє собою A або V; i
 X_{11} являє собою S;
 CDR-L2: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 (SEQ ID NO: 103), де:
 X_1 являє собою E або Q;
 X_2 являє собою D;
 X_3 являє собою S, L, T, A, E або F;
 X_4 являє собою K, T, E, N, Q, S або M;
 X_5 являє собою R;
 X_6 являє собою P; i
 X_7 являє собою S; i
 CDR-L3: X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 (SEQ ID NO: 104), де:
 X_1 являє собою Q;
 X_2 являє собою A;
 X_3 являє собою W;
 X_4 являє собою D;
 X_5 являє собою R, S, M, E, N, G або K;

Х₆ являє собою D або E;
 Х₇ являє собою T, V, A, S або M;
 Х₈ являє собою G, A або C; i
 Х₉ являє собою V.

Переважаю, антигензв'язувальний домен DLL4-зв'язувального білка згідно з винаходом містить щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

залишків 31-37 SEQ ID NO: 1 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO: 1 (CDR-H2); залишків 100-110 SEQ ID NO: 1 (CDR-H3);

залишків 23-33 SEQ ID NO: 111 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO: 111 (CDR-L2); залишків 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: 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: 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: 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: 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: 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 (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); 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 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: 314 (CDR-L2); SEQ ID NO: 315 (CDR-L3);

залишків 31-37 SEQ ID NO: 334 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO: 334 (CDR-H2); залишків 100-110 SEQ ID NO: 334 (CDR-H3);

залишків 23-33 SEQ ID NO: 335 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO: 335 (CDR-L2); залишків 88-96 SEQ ID NO: 335 (CDR-L3);

залишків 31-37 SEQ ID NO: 336 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO: 336 (CDR-H2); залишків 100-110 SEQ ID NO: 336 (CDR-H3);

залишків 23-33 SEQ ID NO: 337 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO: 337 (CDR-L2); залишків 88-96 SEQ ID NO: 337 (CDR-L3);

залишків 31-37 SEQ ID NO: 338 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO: 338 (CDR-H2); залишків 100-110 SEQ ID NO: 338 (CDR-H3);

залишків 23-33 SEQ ID NO: 339 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO: 339 (CDR-L2); залишків 88-

96 SEQ ID NO: 339 (CDR-L3);
 залишків 31-37 SEQ ID NO: 340 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO: 340 (CDR-H2); залишків 100-110 SEQ ID NO: 340 (CDR-H3);
 залишків 23-33 SEQ ID NO: 341 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO: 341 (CDR-L2); залишків 88-96 SEQ ID NO: 341 (CDR-L3);
 залишків 31-37 SEQ ID NO: 342 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO: 342 (CDR-H2); залишків 100-110 SEQ ID NO: 342 (CDR-H3);
 залишків 23-33 SEQ ID NO: 343 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO: 343 (CDR-L2); залишків 88-96 SEQ ID NO: 343 (CDR-L3);
 залишків 31-37 SEQ ID NO: 344 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO: 344 (CDR-H2); залишків 100-110 SEQ ID NO: 344 (CDR-H3);
 залишків 24-34 SEQ ID NO: 345 (CDR-L1); залишків 50-56 SEQ ID NO: 345 (CDR-L2); залишків 89-97 SEQ ID NO: 345 (CDR-L3);
 залишків 31-37 SEQ ID NO: 346 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO: 346 (CDR-H2); залишків 100-110 SEQ ID NO: 346 (CDR-H3);
 залишків 23-33 SEQ ID NO: 347 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO: 347 (CDR-L2); залишків 88-96 SEQ ID NO: 347 (CDR-L3);
 залишків 31-37 SEQ ID NO: 348 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO: 348 (CDR-H2); залишків 100-110 SEQ ID NO: 348 (CDR-H3);
 залишків 24-34 SEQ ID NO: 349 (CDR-L1); залишків 50-56 SEQ ID NO: 349 (CDR-L2); залишків 89-97 SEQ ID NO: 349 (CDR-L3);
 залишків 31-37 SEQ ID NO: 350 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO: 350 (CDR-H2); залишків 100-110 SEQ ID NO: 350 (CDR-H3);
 залишків 24-34 SEQ ID NO: 351 (CDR-L1); залишків 50-56 SEQ ID NO: 351 (CDR-L2); залишків 89-97 SEQ ID NO: 351 (CDR-L3);
 залишків 31-37 SEQ ID NO: 352 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO: 352 (CDR-H2); залишків 100-110 SEQ ID NO: 352 (CDR-H3);
 залишків 24-34 SEQ ID NO: 353 (CDR-L1); залишків 50-56 SEQ ID NO: 353 (CDR-L2); залишків 89-97 SEQ ID NO: 353 (CDR-L3);
 залишків 31-37 SEQ ID NO: 354 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO: 354 (CDR-H2); залишків 100-110 SEQ ID NO: 354 (CDR-H3);
 залишків 24-34 SEQ ID NO: 355 (CDR-L1); залишків 50-56 SEQ ID NO: 355 (CDR-L2); залишків 89-97 SEQ ID NO: 355 (CDR-L3);
 залишків 31-37 SEQ ID NO: 356 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO: 356 (CDR-H2); залишків 100-110 SEQ ID NO: 356 (CDR-H3);
 залишків 23-33 SEQ ID NO: 357 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO: 357 (CDR-L2); залишків 88-96 SEQ ID NO: 357 (CDR-L3);
 залишків 31-37 SEQ ID NO: 358 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO: 358 (CDR-H2); залишків 100-110 SEQ ID NO: 358 (CDR-H3);
 залишків 23-33 SEQ ID NO: 359 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO: 359 (CDR-L2); залишків 88-96 SEQ ID NO: 359 (CDR-L3);
 залишків 31-37 SEQ ID NO: 360 (CDR-H1); залишків 52-67 SEQ ID NO: 360 (CDR-H2); залишків 100-110 SEQ ID NO: 360 (CDR-H3);
 залишків 23-33 SEQ ID NO: 361 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO: 361 (CDR-L2); залишків 88-96 SEQ ID NO: 361 (CDR-L3).

У іншому варіанті винаходу зв'язувальний білок містить щонайменше 3 CDR, описані вище.

Переважно, DLL4-зв'язувальний білок згідно з винаходом містить одну або декілька описаних вище CDR. Більш переважно, вказаний зв'язувальний білок містить три або більше CDR, описаних вище. Найбільш переважно, DLL4-зв'язувальний білок згідно з винаходом містить шість CDR, описаних вище, тобто CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3, описані вище.

У переважному варіанті винаходу зв'язувальний білок містить щонайменше 3 CDR, вибрані з групи, що складається з описаних вище послідовностей.

Більш переважно, зв'язувальний білок містить 3 CDR, вибрані з набору CDR варіабельного домену, вибраного з нижченаведеної групи:

набір VH E9 CDR

CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO: 1,

CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO: 1,

CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO: 1;

набір VL E9 CDR

CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO: 111,

CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO: 111,

CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO: 111;

набір VH E9.4 CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 117,
CDR-H2: SEQ ID NO: 118,
CDR-H3: SEQ ID NO: 119;

набір VL E9.4 CDR

CDR-L1: SEQ ID NO: 229,
CDR-L2: SEQ ID NO: 230,
CDR-L3: SEQ ID NO: 231;

набір VH E9.11 CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 121,
CDR-H2: SEQ ID NO: 122,
CDR-H3: SEQ ID NO: 123;

набір VL E9.11 CDR

CDR-L1: SEQ ID NO: 233,
CDR-L2: SEQ ID NO: 234,
CDR-L3: SEQ ID NO: 235;

набір VH E9.14 CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 125,
CDR-H2: SEQ ID NO: 126,
CDR-H3: SEQ ID NO: 127;

набір VL E9.14 CDR

CDR-L1: SEQ ID NO: 237,
CDR-L2: SEQ ID NO: 238,
CDR-L3: SEQ ID NO: 239;

набір VH E9.17 CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 129,
CDR-H2: SEQ ID NO: 130,
CDR-H3: SEQ ID NO: 131;

набір VL E9.17 CDR

CDR-L1: SEQ ID NO: 241,
CDR-L2: SEQ ID NO: 242,
CDR-L3: SEQ ID NO: 243;

набір VH E9.18 CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 133,
CDR-H2: SEQ ID NO: 134,
CDR-H3: SEQ ID NO: 135;

набір VL E9.18 CDR

CDR-L1: SEQ ID NO: 245,
CDR-L2: SEQ ID NO: 246,
CDR-L3: SEQ ID NO: 247;

набір VH E9.19 CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 137,
CDR-H2: SEQ ID NO: 138,
CDR-H3: SEQ ID NO: 139;

набір VL E9.19 CDR

CDR-L1: SEQ ID NO: 249,
CDR-L2: SEQ ID NO: 250,
CDR-L3: SEQ ID NO: 251;

набір VH E9.22 CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 141,
CDR-H2: SEQ ID NO: 142,
CDR-H3: SEQ ID NO: 143;

набір VL E9.22 CDR

CDR-L1: SEQ ID NO: 253,
CDR-L2: SEQ ID NO: 254,
CDR-L3: SEQ ID NO: 255;

набір VH E9.48 CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 145,
CDR-H2: SEQ ID NO: 146,
CDR-H3: SEQ ID NO: 147;

набір VL E9.48 CDR

CDR-L1: SEQ ID NO: 257,

CDR-L2: SEQ ID NO: 258,
 CDR-L3: SEQ ID NO: 259;
 набір VH E9.65 CDR
 CDR-H1: SEQ ID NO: 149,
 CDR-H2: SEQ ID NO: 150,
 CDR-H3: SEQ ID NO: 151;
 набір VL E9.65 CDR
 CDR-L1: SEQ ID NO: 261,
 CDR-L2: SEQ ID NO: 262,
 CDR-L3: SEQ ID NO: 263;
 набір VH E9.66 CDR
 CDR-H1: SEQ ID NO: 153,
 CDR-H2: SEQ ID NO: 154,
 CDR-H3: SEQ ID NO: 155;
 набір VL E9.66 CDR
 CDR-L1: SEQ ID NO: 265,
 CDR-L2: SEQ ID NO: 266,
 CDR-L3: SEQ ID NO: 267;
 набір VH E9.71 CDR
 CDR-H1: SEQ ID NO: 157,
 CDR-H2: SEQ ID NO: 158,
 CDR-H3: SEQ ID NO: 159;
 набір VL E9.71 CDR
 CDR-L1: SEQ ID NO: 269,
 CDR-L2: SEQ ID NO: 270,
 CDR-L3: SEQ ID NO: 271;
 набір VH E9.13 CDR
 CDR-H1: SEQ ID NO: 161,
 CDR-H2: SEQ ID NO: 162,
 CDR-H3: SEQ ID NO: 163;
 набір VL E9.13 CDR
 CDR-L1: SEQ ID NO: 217,
 CDR-L2: SEQ ID NO: 218,
 CDR-L3: SEQ ID NO: 219;
 набір VH E9.16 CDR
 CDR-H1: SEQ ID NO: 165,
 CDR-H2: SEQ ID NO: 166,
 CDR-H3: SEQ ID NO: 167;
 набір VL E9.16 CDR
 CDR-L1: SEQ ID NO: 221,
 CDR-L2: SEQ ID NO: 222,
 CDR-L3: SEQ ID NO: 223;
 набір VH E9.38 CDR
 CDR-H1: SEQ ID NO: 169,
 CDR-H2: SEQ ID NO: 170,
 CDR-H3: SEQ ID NO: 171;
 набір VL E9.38 CDR
 CDR-L1: SEQ ID NO: 225,
 CDR-L2: SEQ ID NO: 226,
 CDR-L3: SEQ ID NO: 227;
 набір VH E9.2B CDR
 CDR-H1: SEQ ID NO: 173,
 CDR-H2: SEQ ID NO: 174,
 CDR-H3: SEQ ID NO: 175;
 набір VL E9.2B CDR
 CDR-L1: SEQ ID NO: 273,
 CDR-L2: SEQ ID NO: 274,
 CDR-L3: SEQ ID NO: 275;
 набір VH E9.1F CDR
 CDR-H1: SEQ ID NO: 177,
 CDR-H2: SEQ ID NO: 178,
 CDR-H3: SEQ ID NO: 179;

набір VL E9.1F CDR

CDR-L1: SEQ ID NO: 277,

CDR-L2: SEQ ID NO: 278,

CDR-L3: SEQ ID NO: 279;

набір VH E9.10H CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 181,

CDR-H2: SEQ ID NO: 182,

CDR-H3: SEQ ID NO: 183;

набір VL E9.10H CDR

CDR-L1: SEQ ID NO: 301,

CDR-L2: SEQ ID NO: 302,

CDR-L3: SEQ ID NO: 303;

набір VH E9.5E CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 185,

CDR-H2: SEQ ID NO: 186,

CDR-H3: SEQ ID NO: 187;

набір VL E9.5E CDR

CDR-L1: SEQ ID NO: 293,

CDR-L2: SEQ ID NO: 294,

CDR-L3: SEQ ID NO: 295;

набір VH E9.10C CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 189,

CDR-H2: SEQ ID NO: 190,

CDR-H3: SEQ ID NO: 191;

набір VL E9.10C CDR

CDR-L1: SEQ ID NO: 281,

CDR-L2: SEQ ID NO: 282,

CDR-L3: SEQ ID NO: 283;

набір VH E9.7E CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 193,

CDR-H2: SEQ ID NO: 194,

CDR-H3: SEQ ID NO: 195;

набір VL E9.7E CDR

CDR-L1: SEQ ID NO: 289,

CDR-L2: SEQ ID NO: 290,

CDR-L3: SEQ ID NO: 291;

набір VH E9.12B CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 197,

CDR-H2: SEQ ID NO: 198,

CDR-H3: SEQ ID NO: 199;

набір VL E9.12B CDR

CDR-L1: SEQ ID NO: 297,

CDR-L2: SEQ ID NO: 298,

CDR-L3: SEQ ID NO: 299;

набір VH E9.10E CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 201,

CDR-H2: SEQ ID NO: 202,

CDR-H3: SEQ ID NO: 203;

набір VL E9.10E CDR

CDR-L1: SEQ ID NO: 285,

CDR-L2: SEQ ID NO: 286,

CDR-L3: SEQ ID NO: 287;

набір VH E9.6A CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 205,

CDR-H2: SEQ ID NO: 206,

CDR-H3: SEQ ID NO: 207;

набір VL E9.6A CDR

CDR-L1: SEQ ID NO: 305,

CDR-L2: SEQ ID NO: 306,

CDR-L3: SEQ ID NO: 307;

набір VH E9.7A CDR

CDR-H1: SEQ ID NO: 209,

CDR-H2: SEQ ID NO: 210,
 CDR-H3: SEQ ID NO: 211;
 набір VL E9.7A CDR
 CDR-L1: SEQ ID NO: 309,
 CDR-L2: SEQ ID NO: 310,
 CDR-L3: SEQ ID NO: 311;
 набір VH E9.8H CDR
 CDR-H1: SEQ ID NO: 213,
 CDR-H2: SEQ ID NO: 214,
 CDR-H3: SEQ ID NO: 215;
 набір VL E9.8H CDR
 CDR-L1: SEQ ID NO: 313,
 CDR-L2: SEQ ID NO: 314,
 CDR-L3: SEQ ID NO: 315;
 набір VH E9.1 CDR
 CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO: 334,
 CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO: 334,
 CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO: 334;
 набір VL E9.1 CDR
 CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO: 335,
 CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO: 335,
 CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO: 335;
 набір VH E9-SE1 CDR
 CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO: 336,
 CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO: 336,
 CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO: 336;
 набір VL E9-SE1 CDR
 CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO: 337,
 CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO: 337,
 CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO: 337;
 набір VH E9-SE2 CDR
 CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO: 338,
 CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO: 338,
 CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO: 338;
 набір VL E9-SE2 CDR
 CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO: 339,
 CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO: 339,
 CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO: 339;
 набір VH E9-SE3 CDR
 CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO: 340,
 CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO: 340,
 CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO: 340;
 набір VL E9-SE3 CDR
 CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO: 341,
 CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO: 341,
 CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO: 341;
 набір VH E9-SE4 CDR
 CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO: 342,
 CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO: 342,
 CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO: 342;
 набір VL E9-SE4 CDR
 CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO: 343,
 CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO: 343,
 CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO: 343;
 набір VH E9-SE5 CDR
 CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO: 344,
 CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO: 344,
 CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO: 344;
 набір VL E9-SE5 CDR
 CDR-L1: залишки 24-34 SEQ ID NO: 345,
 CDR-L2: залишки 50-56 SEQ ID NO: 345,
 CDR-L3: залишки 89-97 SEQ ID NO: 345;

набір VH E9-SE6 CDR

CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO: 346,
 CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO: 346,
 CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO: 346;
 набір VL E9-SE6 CDR

CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO: 347,
 CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO: 347,
 CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO: 347;

набір VH E9-SE7 CDR

CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO: 348,
 CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO: 348,
 CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO: 348;

набір VL E9-SE7 CDR

CDR-L1: залишки 24-34 SEQ ID NO: 349,
 CDR-L2: залишки 50-56 SEQ ID NO: 349,
 CDR-L3: залишки 89-97 SEQ ID NO: 349;

набір VH E9-SE8 CDR

CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO: 350,
 CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO: 350,
 CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO: 350;

набір VL E9-SE8 CDR

CDR-L1: залишки 24-34 SEQ ID NO: 351,
 CDR-L2: залишки 50-56 SEQ ID NO: 351,
 CDR-L3: залишки 89-97 SEQ ID NO: 351;

набір VH E9-FR1 CDR

CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO: 352,
 CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO: 352,
 CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO: 352;

набір VL E9-FR1 CDR

CDR-L1: залишки 24-34 SEQ ID NO: 353,
 CDR-L2: залишки 50-56 SEQ ID NO: 353,
 CDR-L3: залишки 89-97 SEQ ID NO: 353;

набір VH E9-FR2 CDR

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

набір VL E9-FR2 CDR

CDR-L1: залишки 24-34 SEQ ID NO: 355,
 CDR-L2: залишки 50-56 SEQ ID NO: 355,
 CDR-L3: залишки 89-97 SEQ ID NO: 355;

набір VH E9.71 CDR

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

набір VL E9.71 CDR

CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO: 357,
 CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO: 357,
 CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO: 357;

набір VH E9.71(M) CDR

CDR-H1: залишки 31-37 SEQ ID NO: 358,
 CDR-H2: залишки 52-67 SEQ ID NO: 358,
 CDR-H3: залишки 100-110 SEQ ID NO: 358;

набір VL E9.71(M) CDR

CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO: 359,
 CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO: 359,
 CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO: 359;

набір VH E9.71(L) CDR

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

набір VL E9.71(L) CDR

CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO: 361,

CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO: 361,

CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO: 361.

У іншому варіанті винаходу зв'язувальний білок містить набір з 3 CDR варіабельних важких ланцюгів (VH), вибраних з будь-якого набору з 3 CDR VH у вищезгаданій групі, і набір з 3 CDR варіабельних легких ланцюгів (VL), вибраних з будь-якого набору з 3 CDR VL у вищезгаданій групі.

У іншому варіанті винаходу зв'язувальний білок містить набір з 3 CDR ланцюгів, позначених VH, і набір з 3 CDR ланцюгів, відповідно позначених VL, у вищезгаданій групі. Переважно, зв'язувальний білок згідно з винаходом містить щонайменше два набори CDR варіабельних доменів, вибрані з групи наборів CDR варіабельних доменів, що складається з:

набору VH E9 CDR і набору VL E9 CDR,
 набору VH E9.4 CDR і набору VL E9.4 CDR,
 набору VH E9.11 CDR і набору VL E9.11 CDR,
 набору VH E9.14 CDR і набору VL E9.14 CDR,
 набору VH E9.17 CDR і набору VL E9.17 CDR,
 набору VH E9.18 CDR і набору VL E9.18 CDR,
 набору VH E9.19 CDR і набору VL E9.19 CDR,
 набору VH E9.22 CDR і набору VL E9.22 CDR,
 набору VH E9.48 CDR і набору VL E9.48 CDR,
 набору VH E9.65 CDR і набору VL E9.65 CDR,
 набору VH E9.66 CDR і набору VL E9.66 CDR,
 набору VH E9.71 CDR і набору VL E9.71 CDR,
 набору VH E9.13 CDR і набору VL E9.13 CDR,
 набору VH E9.16 CDR і набору VL E9.16 CDR,
 набору VH E9.38 CDR і набору VL E9.38 CDR,
 набору VH E9.2B CDR і набору VL E9.2B CDR,
 набору VH E9.1F CDR і набору VL E9.1F CDR,
 набору VH E9.10H CDR і набору VL E9.10H CDR,
 набору VH E9.5E CDR і набору VL E9.5E CDR,
 набору VH E9.10C CDR і набору VL E9.10C CDR,
 набору VH E9.7E CDR і набору VL E9.7E CDR,
 набору VH E9.12B CDR і набору VL E9.12B CDR,
 набору VH E9.10E CDR і набору VL E9.10E CDR,
 набору VH E9.6A CDR і набору VL E9.6A CDR,
 набору VH E9.7A CDR і набору VL E9.7A CDR,
 набору VH E9.8H CDR і набору VL E9.8H CDR,
 набору VH E9-SE1 CDR і набору VL E9-SE1 CDR,
 набору VH E9-SE2 CDR і набору VL E9-SE2 CDR,
 набору VH E9-SE3 CDR і набору VL E9-SE3 CDR,
 набору VH E9-SE4 CDR і набору VL E9-SE4 CDR,
 набору VH E9-SE5 CDR і набору VL E9-SE5 CDR,
 набору VH E9-SE6 CDR і набору VL E9-SE6 CDR,
 набору VH E9-SE7 CDR і набору VL E9-SE7 CDR,
 набору VH E9-SE8 CDR і набору VL E9-SE8 CDR,
 набору VH E9-FR1 CDR і набору VL E9-FR1 CDR,
 набору VH E9-FR2 CDR і набору VL E9-FR2 CDR,
 набору VH E9.71 CDR і набору VL E9.71 CDR,
 набору VH E9.71(M) CDR і набору VL E9.71(M) CDR, і
 набору VH E9.71(L) CDR і набору VL E9.71(L) CDR.

У іншому варіанті винаходу описаний вище зв'язувальний білок також містить людську акцепторну каркасну область. Переважно, людська акцепторна каркасна область містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

послідовностей акцепторної каркасної області важкого ланцюга SEQ ID NO: 6-22,

акцепторних послідовностей важкого ланцюга SEQ ID NO: 35-62,

акцепторних послідовностей легкого ланцюга SEQ ID NO: 23-34, і

акцепторних послідовностей легкого ланцюга SEQ ID NO: 63-98.

У іншому варіанті винаходу вищеописаний зв'язувальний білок містить людську акцепторну каркасну область, яка включає щонайменше одну амінокислотну заміну в каркасній області, де вказана амінокислотна послідовність каркасної області щонайменше на 65% ідентична послідовності вказаної людської акцепторної каркасної області і містить щонайменше 70 амінокислотних залишків, ідентичних залишкам вказаної людської акцепторної каркасної області.

У іншому варіанті винаходу описаний тут зв'язувальний білок містить людську акцепторну каркасну область, що включає щонайменше одну амінокислотну заміну в каркасній області в положенні

ключового залишку, де вказаний ключовий залишок вибраний з групи, що складається з:

- залишку, суміжного з CDR;
- залишку сайта глікозилювання;
- рідкого залишку;
- залишку, здатного взаємодіяти з людським DLL4;
- канонічного залишку;

залишку зони контактування варіабельної області важкого ланцюга з варіабельною областю легкого ланцюга;

залишку в зоні Верньєра; і

залишку в області, яка перекривається з областю CDR1 варіабельного важкого ланцюга, визначеною по Чотіа, і з першою каркасною областю важкого ланцюга, визначеною по Кебату. Переважно, ключовий залишок вибраний з групи, що складається з: 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.

У іншому варіанті винаходу описаний тут зв'язувальний білок містить консенсусний людський варіабельний домен.

У переважному варіанті винаходу вищеописаний зв'язувальний білок містить щонайменше один варіабельний домен, який має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з: 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 і 361.

У іншому варіанті винаходу зв'язувальний білок згідно з винаходом містить два варіабельних домени, де вказані два варіабельних домени мають амінокислотні послідовності, вибрані з групи, що складається з: SEQ ID NO: 1 і 111, SEQ ID NO: 116 і 228, SEQ ID NO: 120 і 232, SEQ ID NO: 124 і 236, SEQ ID NO: 128 і 240, SEQ ID NO: 132 і 244, SEQ ID NO: 136 і 248, SEQ ID NO: 140 і 252, SEQ ID NO: 144 і 256, SEQ ID NO: 148 і 260, SEQ ID NO: 152 і 264, SEQ ID NO: 156 і 268, SEQ ID NO: 160 і 216, SEQ ID NO: 164 і 220, SEQ ID NO: 168 і 224, SEQ ID NO: 172 і 272, SEQ ID NO: 176 і 276, SEQ ID NO: 180 і 300, SEQ ID NO: 184 і 292, SEQ ID NO: 188 і 280, SEQ ID NO: 192 і 288, SEQ ID NO: 196 і 296, SEQ ID NO: 200 і 284, SEQ ID NO: 204 і 304, SEQ ID NO: 208 і 308, SEQ ID NO: 212 і 312, SEQ ID NO: 334 і 335, SEQ ID NO: 336 і 337, SEQ ID NO: 338 і 339, SEQ ID NO: 340 і 341, SEQ ID NO: 342 і 343, SEQ ID NO: 344 і 345, SEQ ID NO: 346 і 347, SEQ ID NO: 348 і 349, SEQ ID NO: 350 і 351, SEQ ID NO: 352 і 353, SEQ ID NO: 354 і 355, SEQ ID NO: 356 і 357, SEQ ID NO: 358 і 359, SEQ ID NO: 360 і 361.

У одному з варіантів винаходу зв'язувальний білок згідно з винаходом містить варіабельний домен важкого ланцюга (VH), де, переважно, VH включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

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 і 360.

У іншому варіанті винаходу зв'язувальний білок згідно з винаходом містить варіабельний домен легкого ланцюга (VL), де, переважно, VL включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

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 і 361.

У переважному варіанті винаходу зв'язувальний білок згідно з винаходом містить VH і VL, де, переважно, VH і VL являють собою будь-яку з описаних вище послідовностей.

У іншому варіанті даний винахід стосується зв'язувального білка, що має здатність зв'язуватися з людським DLL-4, де вказаний зв'язувальний білок містить:

константну область важкого ланцюга Ig, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 3;

константну область легкого ланцюга Ig, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 4 і SEQ ID NO: 5;

варіабельну область важкого ланцюга Ig, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

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 і 360; і

варіабельну область легкого ланцюга Ig, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

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 і 361.

У іншому аспекті даний винахід стосується зв'язувального білка, який містить антигензв'язувальний домен, що має здатність зв'язуватися з людським DLL4, де вказаний антигензв'язувальний домен містить щонайменше одну або декілька CDR, вибраних з групи, що складається з:

CDR-H1: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅ (SEQ ID NO: 105), де

X₁ являє собою S, N або D;

X₂ являє собою H або Y;

X₃ являє собою W;

X₄ являє собою M;

X₅ являє собою S або H;

CDR-H2: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆-X₁₇ (SEQ ID NO: 106), де:

X₁ являє собою I, D, M або T;

X₂ являє собою I;

X₃ являє собою S;

X₄ являє собою Y, N, S, Q, V, T, H або D;

X₅ являє собою D;

X₆ являє собою G;

X₇ являє собою S, R, I, T, G, K, H або N;

X₈ являє собою N, Y, S, I або T;

X₉ являє собою K, M, N, Q, E, T, R, S, A або L;

X₁₀ являє собою Y, D або E;

X₁₁ являє собою S або Y;

X₁₂ являє собою A;

X₁₃ являє собою D;

X₁₄ являє собою S;

X₁₅ являє собою V;

X₁₆ являє собою K; i

X₁₇ являє собою G;

CDR-H3: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀ (SEQ ID NO: 107), де:

X₁ являє собою A;

X₂ являє собою G, A або R;

X₃ являє собою G;

X₄ являє собою G, S або A;

X₅ являє собою N;

X₆ являє собою V або M;

X₇ являє собою G;

X₈ являє собою F, L, Y або M;

X₉ являє собою D; i

X₁₀ являє собою I, S або L;

CDR-L1: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁ (SEQ ID NO: 108), де:

X₁ являє собою S;

X₂ являє собою A або G;

X₃ являє собою D;

X₄ являє собою K, N, L, Q, M, E, S, T, G або D;

X₅ являє собою L;

X₆ являє собою G;

X₇ являє собою T, S, N, A, G або E;

X₈ являє собою K, Q, N або R;

X₉ являє собою Y;

X₁₀ являє собою V або I; i

X₁₁ являє собою S;

CDR-L2: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (SEQ ID NO: 109), де:

X₁ являє собою Q;

X₂ являє собою D;

X₃ являє собою A, G, W, S або D;

X₄ являє собою K, M, Q, N, L, T, I або E;

X₅ являє собою R;

X₆ являє собою P; i

X₇ являє собою S; i

CDR-L3: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉ (SEQ ID NO: 110), де:

X₁ являє собою Q;
 X₂ являє собою S або A;
 X₃ являє собою W;
 X₄ являє собою D;
 X₅ являє собою R, S, Q, P, A, V, W або M;
 X₆ являє собою S, G, I, N, R або T;
 X₇ являє собою D або G;
 X₈ являє собою V, A, P або E; i
 X₉ являє собою V.

Переважно, антигензв'язувальний домен DLL4-зв'язувального білка згідно з винаходом містить щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

залишків 31-35 SEQ ID NO: 112 (CDR-H1); залишків 50-66 SEQ ID NO: 112 (CDR-H2); залишків 99-108 SEQ ID NO: 112 (CDR-H3);
 залишків 23-33 SEQ ID NO: 113 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO: 113 (CDR-L2); залишків 88-96 SEQ ID NO: 113 (CDR-L3);
 залишків 31-35 SEQ ID NO: 316 (CDR-H1); залишків 50-66 SEQ ID NO: 316 (CDR-H2); залишків 99-108 SEQ ID NO: 316 (CDR-H3);
 залишків 31-35 SEQ ID NO: 317 (CDR-H1); залишків 50-66 SEQ ID NO: 317 (CDR-H2); залишків 99-108 SEQ ID NO: 317 (CDR-H3);
 залишків 31-35 SEQ ID NO: 318 (CDR-H1); залишків 50-66 SEQ ID NO: 318 (CDR-H2); залишків 99-108 SEQ ID NO: 318 (CDR-H3);
 залишків 31-35 SEQ ID NO: 319 (CDR-H1); залишків 50-66 SEQ ID NO: 319 (CDR-H2); залишків 99-108 SEQ ID NO: 319 (CDR-H3);
 залишків 31-35 SEQ ID NO: 320 (CDR-H1); залишків 50-66 SEQ ID NO: 320 (CDR-H2); залишків 99-108 SEQ ID NO: 320 (CDR-H3);
 залишків 31-35 SEQ ID NO: 321 (CDR-H1); залишків 50-66 SEQ ID NO: 321 (CDR-H2); залишків 99-108 SEQ ID NO: 321 (CDR-H3);
 залишків 31-35 SEQ ID NO: 322 (CDR-H1); залишків 50-66 SEQ ID NO: 322 (CDR-H2); залишків 99-108 SEQ ID NO: 322 (CDR-H3);
 залишків 31-35 SEQ ID NO: 323 (CDR-H1); залишків 50-66 SEQ ID NO: 323 (CDR-H2); залишків 99-108 SEQ ID NO: 323 (CDR-H3);
 залишків 31-35 SEQ ID NO: 324 (CDR-H1); залишків 50-66 SEQ ID NO: 324 (CDR-H2); залишків 99-108 SEQ ID NO: 324 (CDR-H3);
 залишків 31-35 SEQ ID NO: 325 (CDR-H1); залишків 50-66 SEQ ID NO: 325 (CDR-H2); залишків 99-108 SEQ ID NO: 325 (CDR-H3);
 залишків 31-35 SEQ ID NO: 326 (CDR-H1); залишків 50-66 SEQ ID NO: 326 (CDR-H2); залишків 99-108 SEQ ID NO: 326 (CDR-H3);
 залишків 23-33 SEQ ID NO: 327 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO: 327 (CDR-L2); залишків 88-96 SEQ ID NO: 327 (CDR-L3);
 залишків 23-33 SEQ ID NO: 328 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO: 328 (CDR-L2); залишків 88-96 SEQ ID NO: 328 (CDR-L3);
 залишків 23-33 SEQ ID NO: 329 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO: 329 (CDR-L2); залишків 88-96 SEQ ID NO: 329 (CDR-L3);
 залишків 23-33 SEQ ID NO: 330 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO: 330 (CDR-L2); залишків 88-96 SEQ ID NO: 330 (CDR-L3);
 залишків 23-33 SEQ ID NO: 331 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO: 331 (CDR-L2); залишків 88-96 SEQ ID NO: 331 (CDR-L3);
 залишків 23-33 SEQ ID NO: 332 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO: 332 (CDR-L2); залишків 88-96 SEQ ID NO: 332 (CDR-L3);
 залишків 23-33 SEQ ID NO: 333 (CDR-L1); залишків 49-55 SEQ ID NO: 333 (CDR-L2); залишків 88-96 SEQ ID NO: 333 (CDR-L3).

У іншому варіанті винаходу зв'язувальний білок містить щонайменше 3 CDR, описані вище.

Переважно, DLL4-зв'язувальний білок згідно з винаходом містить одну або декілька описаних вище CDR. Більш переважно, вказаний зв'язувальний білок містить три або більше CDR, описаних вище. Найбільш переважно, DLL4-зв'язувальний білок згідно з винаходом містить шість CDR, описаних вище, тобто CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3, описані вище.

У переважному варіанті винаходу зв'язувальний білок містить щонайменше 3 CDR, вибрані з групи, що складається з описаних вище послідовностей.

У іншому переважному варіанті винаходу, зв'язувальний білок містить 3 CDR, вибрані з набору CDR варіабельного домену, вибраного з нижченаведеної групи:

набір VH A10 CDR

CDR-H1: залишки 31-35 SEQ ID NO: 112,

CDR-H2: залишки 50-66 SEQ ID NO: 112,
 CDR-H3: залишки 99-108 SEQ ID NO: 112;
 набір VL A10 CDR
 CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO: 113,
 CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO: 113,
 CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO: 113;
 набір VH A10.3 CDR
 CDR-H1: залишки 31-35 SEQ ID NO: 316,
 CDR-H2: залишки 50-66 SEQ ID NO: 316,
 CDR-H3: залишки 99-108 SEQ ID NO: 316;
 набір VL A10.3 CDR
 CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO: 327,
 CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO: 327,
 CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO: 327;
 набір VH A10.K30 CDR
 CDR-H1: залишки 31-35 SEQ ID NO: 317,
 CDR-H2: залишки 50-66 SEQ ID NO: 317,
 CDR-H3: залишки 99-108 SEQ ID NO: 317;
 набір VH A10.K42 CDR
 CDR-H1: залишки 31-35 SEQ ID NO: 318,
 CDR-H2: залишки 50-66 SEQ ID NO: 318,
 CDR-H3: залишки 99-108 SEQ ID NO: 318;
 набір VH A10.9A CDR
 CDR-H1: залишки 31-35 SEQ ID NO: 319,
 CDR-H2: залишки 50-66 SEQ ID NO: 319,
 CDR-H3: залишки 99-108 SEQ ID NO: 319;
 набір VH A10.8A CDR
 CDR-H1: залишки 31-35 SEQ ID NO: 320,
 CDR-H2: залишки 50-66 SEQ ID NO: 320,
 CDR-H3: залишки 99-108 SEQ ID NO: 320;
 набір VH A10.1A CDR
 CDR-H1: залишки 31-35 SEQ ID NO: 321,
 CDR-H2: залишки 50-66 SEQ ID NO: 321,
 CDR-H3: залишки 99-108 SEQ ID NO: 321;
 набір VH A10.5D CDR
 CDR-H1: залишки 31-35 SEQ ID NO: 322,
 CDR-H2: залишки 50-66 SEQ ID NO: 322,
 CDR-H3: залишки 99-108 SEQ ID NO: 322;
 набір VH A10.3A CDR
 CDR-H1: залишки 31-35 SEQ ID NO: 323,
 CDR-H2: залишки 50-66 SEQ ID NO: 323,
 CDR-H3: залишки 99-108 SEQ ID NO: 323;
 набір VL A10.3A CDR
 CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO: 330,
 CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO: 330,
 CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO: 330;
 набір VH A10.6B CDR
 CDR-H1: залишки 31-35 SEQ ID NO: 324,
 CDR-H2: залишки 50-66 SEQ ID NO: 324,
 CDR-H3: залишки 99-108 SEQ ID NO: 324;
 набір VL A10.6B CDR
 CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO: 331,
 CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO: 331,
 CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO: 331;
 набір VH A10.3D CDR
 CDR-H1: залишки 31-35 SEQ ID NO: 325,
 CDR-H2: залишки 50-66 SEQ ID NO: 325,
 CDR-H3: залишки 99-108 SEQ ID NO: 325;
 набору VL A10.3D CDR
 CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO: 332,
 CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO: 332,
 CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO: 332;

набір VH A10.4C CDR

CDR-H1: залишки 31-35 SEQ ID NO: 326,

CDR-H2: залишки 50-66 SEQ ID NO: 326,

CDR-H3: залишки 99-108 SEQ ID NO: 326;

набір VL A10.4C CDR

CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO: 333,

CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO: 333,

CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO: 333;

набір VL A10.L45 CDR

CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO: 328,

CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO: 328,

CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO: 328;

набір VL A10.L73 CDR

CDR-L1: залишки 23-33 SEQ ID NO: 329,

CDR-L2: залишки 49-55 SEQ ID NO: 329,

CDR-L3: залишки 88-96 SEQ ID NO: 329.

У іншому варіанті винаходу зв'язувальний білок містить набір з 3 CDR варіабельних важких ланцюгів (VH), вибраних з будь-якого набору з 3 CDR VH у вищезгаданій групі, і набір з 3 CDR варіабельних легких ланцюгів (VL), вибраних з будь-якого набору з 3 CDR VL у вищезгаданій групі.

У іншому варіанті винаходу зв'язувальний білок містить набір з 3 CDR ланцюгів, позначених VH, і набір з 3 CDR ланцюгів, відповідно позначених VL у вищезгаданій групі. Переважно, зв'язувальний білок згідно з винаходом містить щонайменше два набори CDR варіабельних доменів, вибрані з групи наборів CDR варіабельних доменів, що складається з:

набору VH A10 CDR і набору VL A10 CDR;

набору VH A10.3 CDR і набору VL A10.3 CDR;

набору VH A10.3A CDR і набору VL A10.3A CDR;

набору VH A10.6B CDR і набору VL A10.6B CDR;

набору VH A10.3D CDR і набору VL A10.3D CDR;

набору VH A10.4C CDR і набору VL A10.4C CDR;

набору VH A10.K30 CDR і набору VL A10.3 CDR;

набору VH A10.K42 CDR і набору VL A10.3 CDR;

набору VH A10.3 CDR і набору VL A10.L45 CDR;

набору VH A10.3 CDR і набору VL A10.L73 CDR;

набору VH A10.9A CDR і набору VL A10.3 CDR;

набору VH A10.8A CDR і набору VL A10.3 CDR;

набору VH A10.1A CDR і набору VL A10.3 CDR; і

набору VH A10.5D CDR і набору VL A10.3 CDR.

У іншому варіанті винаходу описаний вище зв'язувальний білок також містить людську акцепторну каркасну область. Переважно, людська акцепторна каркасна область містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

послідовностей акцепторної каркасної області важкого ланцюга SEQ ID NO: 6-22,

акцепторних послідовностей важкого ланцюга SEQ ID NO: 35-62,

акцепторних послідовностей легкого ланцюга SEQ ID NO: 23-34 і

акцепторних послідовностей легкого ланцюга SEQ ID NO: 63-98.

У іншому варіанті винаходу вищеописаний зв'язувальний білок містить людську акцепторну каркасну область, яка включає щонайменше одну амінокислотну заміну в каркасній області, де вказана амінокислотна послідовність каркасної області щонайменше на 65% ідентична послідовності вказаної людської акцепторної каркасної області і містить щонайменше 70 амінокислотних залишків, ідентичних залишкам вказаної людської акцепторної каркасної області.

У іншому варіанті винаходу описаний тут зв'язувальний білок містить людську акцепторну каркасну область, що включає щонайменше одну амінокислотну заміну в каркасній області в положенні ключового залишку, де вказаний ключовий залишок вибраний з групи, що складається з:

залишку, суміжного з CDR;

залишку сайту глікозилювання;

рідкого залишку;

залишку, здатного взаємодіяти з людським DLL4;

канонічного залишку;

залишку зони контактування варіабельної області важкого ланцюга з варіабельною областю легкого ланцюга;

залишку в зоні Верньєра; і

залишку в області, яка перекривається з областю CDR1 варіабельного важкого ланцюга, визначеною по Чотіа, і з першою каркасною областю важкого ланцюга, визначеною по Кебату.

Переважно, ключовий залишок вибраний з групи, що складається з: 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.

У іншому варіанті винаходу описаний тут зв'язувальний білок містить консенсусний людський варіабельний домен.

У переважному варіанті винаходу вищеописаний зв'язувальний білок містить щонайменше один варіабельний домен, який має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з: SEQ ID NO: 112, 113, 316, 327, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 330, 324, 331, 325, 332, 326, 333, 328 і 329.

У іншому варіанті винаходу вищеописаний зв'язувальний білок містить два варіабельних домени, де вказані два варіабельних домени мають амінокислотні послідовності, вибрані з групи, що складається з SEQ ID NO: 112 і 113, SEQ ID NO: 316 і 327, SEQ ID NO: 323 і 330, SEQ ID NO: 324 і 331, SEQ ID NO: 325 і 332 і SEQ ID NO: 326 і 333.

У одному з варіантів винаходу зв'язувальний білок згідно з винаходом містить варіабельний домен важкого ланцюга (VH), де, переважно, VH включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 112, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325 і 326.

У іншому варіанті винаходу зв'язувальний білок згідно з винаходом містить варіабельний домен легкого ланцюга (VL), де, переважно, VL включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 113, 327, 328, 329, 330, 331, 332 і 333.

У іншому варіанті даний винахід стосується зв'язувального білка, що має здатність зв'язуватися з людським DLL-4, де вказаний зв'язувальний білок містить:

константну область важкого ланцюга Ig, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 3;

константну область легкого ланцюга Ig, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 4 і SEQ ID NO: 5;

варіабельну область важкого ланцюга Ig, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 112, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325 і 326; і

варіабельну область легкого ланцюга Ig, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 113, 327, 328, 329, 330, 331, 332 і 333.

Відповідно до даного винаходу варіабельні домени важкого ланцюга (VH) і варіабельні домени легкого ланцюга (VL) DLL4-зв'язувальних білків, описаних в даній заявці, можуть бути також піддані процедурі перестановки ланцюгів рекомбінантними методами, відомими фахівцям, з метою одержання і відбору додаткових DLL4-зв'язувальних білків, що містять різні комбінації описаних тут доменів VH і VL.

У переважному варіанті винаходу DLL4-зв'язувальний білок згідно з винаходом зв'язується з людським DLL4 (huDLL4) і щонайменше з одним DLL4 іншого виду. Більш переважно, описаний тут DLL4-зв'язувальний білок зв'язується з людським DLL4 і DLL4, вибраним з групи, що складається з мишачого DLL4 (muDLL4), DLL4 яванського макака (DLL4 яванського макака, cynoDLL4), щурячого DLL4 і їх комбінацій.

У іншому варіанті винаходу DLL4-зв'язувальним білком є повністю людське антитіло або його антигензв'язувальна частина.

У іншому варіанті винаходу DLL4-зв'язувальним білком є CDR-прищеплене антитіло. Більш переважно, DLL4-зв'язувальний білок являє собою CDR-прищеплене антитіло або його антигензв'язувальну частину, що містить одну або декілька описаних вище CDR.

Ще більш переважно, CDR-прищеплене антитіло або його антигензв'язувальна частина містять описаний вище варіабельний домен. Більш переважно, CDR-прищеплене антитіло або його антигензв'язувальна частина містять два вищеописаних варіабельних домени. Переважно, CDR-прищеплене антитіло або його антигензв'язувальна частина містять людську акцепторну каркасну область. Більш переважно, вказаною людською акцепторною каркасною областю є будь-яка з вищеописаних людських акцепторних каркасних областей.

Більш переважно, зв'язувальний білок має здатність нейтралізувати активність DLL4, вибраного з групи, що складається з людського DLL4, мишачого DLL4, DLL4 яванського макака, щурячого DLL4 і їх комбінацій. Оцінка нейтралізації активності DLL4 може бути проведена за допомогою декількох *in vitro* і *in vivo* аналізів, відомими фахівцям. Репрезентативними параметрами для оцінки нейтралізації активності DLL4 є, але не обмежуються ними, антитіла, які інгібують взаємодію DLL4 з рецептором Notch і/або шлях передачі Notch-сигналу при величинах IC_{50} , що складають приблизно щонайменше 10^{-6} M; щонайменше 10^{-7} M або щонайменше 10^{-8} M.

У одному з варіантів винаходу зв'язувальний білок згідно з винаходом має константу швидкості асоціації (K_{on}) відносно DLL4, що складає щонайменше приблизно 10^2 $M^{-1}s^{-1}$; щонайменше приблизно 10^3 $M^{-1}s^{-1}$; щонайменше приблизно 10^4 $M^{-1}s^{-1}$; щонайменше приблизно 10^5 $M^{-1}s^{-1}$ або щонайменше приблизно 10^6 $M^{-1}s^{-1}$, як було виміряно методом поверхневого плазмонного резонансу. Переважно, зв'язувальний білок згідно з винаходом має константу швидкості асоціації (K_{on}) відносно DLL4, що

складає в межах $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ - $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ - $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ - $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ або $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ - $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, як було виміряно методом поверхневого плазмонного резонансу.

У іншому варіанті винаходу, зв'язувальний білок згідно з винаходом має константу швидкості дисоціації (K_{off}) відносно DLL4, що складає приблизно максимум 10^{-3} s^{-1} ; приблизно максимум 10^{-4} s^{-1} ; приблизно максимум 10^{-5} s^{-1} або приблизно максимум 10^{-6} s^{-1} , як було виміряно методом поверхневого плазмонного резонансу. Переважно, зв'язувальний білок згідно з винаходом має константу швидкості дисоціації (K_{off}) відносно DLL4, що складає в межах 10^{-3} s^{-1} - 10^{-4} s^{-1} ; 10^{-4} s^{-1} - 10^{-5} s^{-1} або 10^{-5} s^{-1} - 10^{-6} s^{-1} , як було виміряно методом поверхневого плазмонного резонансу.

У іншому варіанті винаходу, зв'язувальний білок згідно з винаходом має константу дисоціації (K_D) відносно DLL4, що складає приблизно максимум 10^{-7} M ; приблизно максимум 10^{-8} M ; приблизно максимум 10^{-9} M ; приблизно максимум 10^{-10} M ; приблизно максимум 10^{-11} M ; приблизно максимум 10^{-12} M і максимум 10^{-13} M . Переважно, зв'язувальний білок згідно з винаходом має константу дисоціації (K_D) відносно DLL4, що становить 10^{-7} M - 10^{-8} M ; 10^{-8} M - 10^{-9} M ; 10^{-9} M - 10^{-10} M ; 10^{-10} M - 10^{-11} M ; 10^{-11} M - 10^{-12} M або 10^{-12} M - 10^{-13} M .

У одному з варіантів даний винахід стосується конструкції антитіла, що включає будь-який з вищеписаних DLL4-зв'язувальних білків і поліпептидний лінкер або константний домен імуноглобуліну. У переважному варіанті винаходу конструкцію антитіла згідно з винаходом вибирають з групи, що складається з молекули імуноглобуліну, моноклонального антитіла, химерного антитіла, CDR-прищепленого антитіла, гуманізованого антитіла, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fv, зв'язаного дисульфідним зв'язком, scFv, однодоменного антитіла, діантитіла, мультиспецифічного антитіла, антитіла з подвійною специфічністю і біспецифічного антитіла.

У переважному варіанті винаходу конструкція антитіла згідно з винаходом містить константний домен важкого ланцюга імуноглобуліну, вибраний з групи, що складається з константного домену людського IgM, константного домену людського IgG1, константного домену людського IgG2, константного домену людського IgG3, константного домену людського IgG4, константного домену людського IgE і константного домену людського IgA, і мутантів Ig вищезгаданих підтипів, які можуть модифікувати зв'язування з рецептором Fc-гамма, зв'язування з FcRn і зв'язування з C1q і можуть змінювати фармакокінетичні властивості і/або ефекторні функції Fc.

У іншому варіанті винаходу конструкція антитіла є глікозилованою. Переважно, вказаний профіль глікозилювання є характерним для людини.

У іншому варіанті винаходу описаний тут DLL4-зв'язувальний білок кон'югований з агентом. Кон'югатами зв'язувального білка згідно з винаходом є кон'югати антитіл, в яких описана тут конструкція антитіла кон'югована з агентом. Вказаний агент переважно вибирають з групи, що складається з молекули імуноадгезину, візуалізуючого агента, терапевтичного засобу і цитотоксичного агента. У переважному варіанті винаходу візуалізуючий агент вибраний з групи, що складається з радіоактивної мітки, ферменту, флуоресцентної мітки, люмінесцентної мітки, біоломінесцентної мітки, магнітної мітки і біотину. Більш переважно, вказаним візуалізуючим агентом є радіоактивна мітка, вибрана з групи, що складається з: ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁷⁷Lu, ¹⁶⁶Ho і ¹⁵³Sm. У переважному варіанті винаходу терапевтичний або цитотоксичний засіб вибраний з групи, що складається з антиметаболіту, алкілувального агента, антибіотика, фактора росту, цитокіну, антиангіогенного агента, антимітотичного засобу, антрацикліну, токсину і апоптотичного агента.

У іншому варіанті винаходу описані вище DLL4-зв'язувальний білок, конструкція антитіла або кон'югат зв'язувального білка (включаючи кон'югати антитіла) присутні у вигляді кристалів. Переважним кристалом є фармацевтичний кристал, що не містить носія, з контрольованим вивільненням. У переважному варіанті винаходу вказані кристалізований зв'язувальний білок, кристалізована конструкція антитіла або кристалізований кон'югат антитіла мають більш тривалий час напівжиття *in vivo*, ніж їх розчинний аналог. У іншому переважному варіанті винаходу вказані кристалізований зв'язувальний білок, кристалізована конструкція антитіла або кристалізований кон'югат зв'язувального білка (включаючи кон'югат антитіла) зберігають біологічну активність після кристалізації.

У одному зі своїх аспектів, даний винахід стосується ізольованої нуклеїнової кислоти, що кодує DLL4-зв'язувальний білок, конструкцію антитіла, кон'югат DLL4-зв'язувального антитіла або його DLL4-зв'язувальну частину. Особливо переважною є ізольована нуклеїнова кислота, яка кодує поліпептид, вибраний з групи, що складається з: поліпептиду, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, де вказаний варіабельний домен важкого ланцюга включає CDR-H1, CDR-H2 або CDR-H3, описані вище; поліпептиду, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, де вказаний варіабельний домен легкого ланцюга включає CDR-L1, CDR-L2 або CDR-L3, описані вище, або комбінації обох поліпептидів.

У іншому варіанті даний винахід стосується вектора, що містить описану вище ізольовану нуклеїнову кислоту. У переважному варіанті винаходу вказаний вектор вибраний з групи, що складається з: pcDNA, pTT (Durocher et al., Nucl. Acids Res., 30(2e9): 1-9 (2002)), pTT3 (pTT з додатковими сайтами множинного клонування), pEFBOS (Mizushima et al., Nucl. Acids. Res., 18 (17):

5322 (1990)), pHybE, pBV, pJV і pBJ, і будь-яких інших експресійних векторів, придатних для їх використання в прокаріотичних або еукаріотичних клітинах.

У іншому аспекті даний винахід стосується клітини-хазяїна, трансформованої вищеописаним вектором. Вказаною клітиною-хазяїном може бути прокаріотична або еукаріотична клітина. Переважною прокаріотичною клітиною-хазяїном є *Escherichia coli*. Переважно, еукаріотична клітина вибрана з групи, що складається з клітини протиста, клітини тварини, клітини рослини і клітини грибів. Більш переважно, клітиною-хазяїном є клітина ссавця, включаючи, але не обмежуючись ними, клітини CHO і COS. Переважними клітинами грибів є, але не обмежуються ними, клітини *Saccharomyces cerevisiae*. Переважною клітиною комахи є клітина Sf9.

У іншому аспекті даний винахід стосується способу продукування зв'язувального білка, який зв'язується з людським DLL4, де вказаний спосіб включає стадію культивування будь-якої з вищеописаних клітин-хазяїнів в культуральному середовищі в умовах, придатних для продукування зв'язувального білка, який зв'язується з людським DLL4. У іншому варіанті даний винахід стосується зв'язувального білка, одержаного способом, описаним вище.

У одному з варіантів даний винахід стосується композиції для вивільнення DLL4-зв'язувального білка згідно з винаходом, де вказана композиція містить склад, який, в свою чергу, містить кристалізований DLL4-зв'язувальний білок, кристалізовану конструкцію антитіла або кристалізований кон'югат зв'язувального білка (включаючи кон'югати антитіла), описані вище; і інгредієнт, а також щонайменше один полімерний носій. Переважним полімерним носієм є полімер, вибраний з однієї або декількох груп, що складаються з поліакрилової кислоти, поліціаноакрилатів, поліамінокислот, поліангідридів, полідепептидів, поліефірів, полімолочної кислоти, співполімеру молочної і гліколевої кислоти або PLGA, полі-β-гідроксибутирату, полікапролактону, полідіоксанону, поліетиленгліколю, полігідроксипропілметакриламиду, поліорганосфосфазену, поліортоефірів, полівінілового спирту, полівінілпіролідону, співполімерів малеїнового ангідриду-алкілвінілового ефіру, поліолів плуроніків, альбуміну, альгінату, целюлози і похідних целюлози, колагену, фібрину, желатину, гіалуронової кислоти, олігосахаридів, глікаміногліканів, сульфатованих полісахаридів і їх сумішей і співполімерів. Переважно, вказаний інгредієнт вибраний з групи, що складається з альбуміну, сахарози, трегалози, лактиту, желатину, гідроксипропіл-β-циклодекстрину, метоксиполіетиленгліколю і поліетиленгліколю.

У іншому варіанті даний винахід стосується способу лікування ссавця, який включає стадію введення вказаному ссавцю ефективної кількості композиції, що містить кристалізований DLL4-зв'язувальний білок, кристалізовану конструкцію антитіла або кристалізований кон'югат білка (включаючи кон'югати антитіла), описані вище.

Даний винахід також стосується фармацевтичної композиції, що містить DLL4-зв'язувальний білок, конструкцію антитіла або кон'югат білка (включаючи кон'югати антитіла), описані вище, і фармацевтично прийнятний носій. У іншому варіанті винаходу фармацевтична композиція містить щонайменше один додатковий агент. Вказаним додатковим агентом може бути терапевтичний засіб, використовуваний для лікування розладу, асоційованого з негативним впливом DLL4. Переважно, фармацевтична композиція містить додатковий агент, вибраний з групи, що складається з терапевтичного засобу, візуалізуючого агента, протипухлинного засобу; хіміотерапевтичного засобу (такого як ДНК-алкілувальний агент, цисплатин, карбоплатин, антитубуліновий агент, паклітаксел, доцетаксел, доксорубіцин, гемцитабін, гемзар, антрациклін, адриаміцин, інгібітор топоізомерази I, інгібітор топоізомерази II, 5-фторурацил (5-FU), лейковорин, іринотекан) і інгібіторів тирозинкіназних рецепторів (наприклад, ерлотинібу, гефітинібу), інгібітору COX-2 (наприклад, целекоксибу), інгібітору кінази і інгібітору ангиогенезу (включаючи, але не обмежуючись ними, анти-VEGF антитіло або VEGF-пастка); блокатора костимулюючої молекули (включаючи, але не обмежуючись ними, анти-B7.1 антитіло, анти-B7.2 антитіло, CTLA4-Ig, анти-CD20 антитіло); блокатора адгезивної молекули (включаючи, але не обмежуючись ними, анти-LFA-1 антитіло, антитіло проти E/L-селектину і інгібітор невеликої молекули); антитіла проти цитокінів або його функціонального фрагмента (включаючи, але не обмежуючись ними, анти-IL-18 антитіло, анти-TNF антитіло і анти-IL-6 антитіло/антитіло проти рецептора цитокіну), метотрексату, циклоспорину, рапаміцину, FK506, детектованої мітки або репортера, антагоніста TNF, протиревматичного засобу, м'язового релаксantu, наркотичного засобу, нестероїдного протизапального засобу (НСПЗЗ), анагетіку, анестетику, седативного засобу, місцевого анестетику, нейром'язового блокатора, протимікробного засобу, засобу проти псоріазу, кортикостероїду, анаболічного стероїду, еритропоетину, імунізуючого засобу, імуноглобуліну, імунодепресantu, гормону росту, лікарського засобу для гормонзамісної терапії, радіофармацевтичного засобу, антидепресantu, антипсихотичного засобу, стимулятора, протиастматичного лікарського засобу, бета-агоніста, стероїду, що вводиться шляхом інгаляції, епінефрину або його аналога, цитокіну і антагоніста цитокіну.

У іншому аспекті даний винахід стосується способу інгібування активності людського DLL4, який включає контактування людського DLL4 з описаним вище зв'язувальним білком в цілях інгібування або нейтралізації людського DLL4. У своєму спорідненому аспекті, даний винахід стосується способу

інгібування активності DLL4 у людини, страждаючої розладом, асоційованим з негативним впливом DLL4, де вказаний спосіб включає введення вказаній людині вищеописаного зв'язувального білка в цілях інгібування людського DLL4 у людини і лікування вказаного пацієнта, страждаючого даним розладом. Вказаний розлад переважно вибраний з групи, що включає первинний і метастатичний рак, включаючи карциноми молочної залози, товстої кишки, прямої кишки, легень, ротоглотки, гортані, стравоходу, шлунка, підшлункової залози, печінки, жовчного міхура і жовчних проток, тонкої кишки, сечових шляхів (включаючи нирки, сечовий міхур і уретелій), жіночих статевих органів (включаючи шийку матки, матку і яєчники, а також хоріокарциноми і трофобластоз у вагітних), чоловічих статевих органів (включаючи передміхурову залізу, сім'яні пухирці, яєчка і ембріональноклітинні пухлини), ендокринних залоз (включаючи щитовидну залозу, кору надниркової залози і гіпофіз) і шкіри, а також гемангіоми, меланоми, саркоми (включаючи саркоми кісток і м'яких тканин, а також саркому Капоші), пухлини головного мозку, нервових тканин, очей і мозкової оболонки (включаючи астроцити, гліоми, гліобластоми, ретинобластоми, неврони, нейробластоми, шваноми і менінгіоми), солідні пухлини, що походять від гемопоетичних злоякісних пухлин, такі як лейкоз і лімфоми (ходжкінська і неходжкінська лімфоми), метастази пухлини, очну неоваскуляризацію (включаючи сліпоту при діабеті, ретинопатію, вікову дегенерацію жовтої плями і почервоніння), набряки, ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, атеросклеротичні бляшки, хворобу Крона, запальне захворювання кишечника, асцит, що важко піддається лікуванню, псоріаз, саркоїдоз, артеріосклероз, сепсис, пептичні виразки, опіки, панкреатит, полікістоз яєчника (ПКЯ), ендометріоз, фіброму матки, злоякісну гіпертрофію передміхурової залози і інші асоційовані і неасоційовані з ангіогенезом захворювання, що характеризуються аберантною активністю DLL4.

У іншому аспекті даний винахід стосується способу лікування пацієнта, страждаючого розладом, асоційованим з негативним впливом людського DLL4, де вказаний спосіб включає стадію введення будь-якого з описаних вище зв'язувальних білків до, під час або після введення другого агента, описаного вище. У переважному варіанті винаходу вказаний другий агент вибраний з групи, що складається з: засобу для променевої терапії; протипухлинного засобу; хіміотерапевтичного засобу (такого як ДНК-алкілювальний агент, цисплатин, карбоплатин, антитубуліновий агент, паклітаксел, доцетаксел, таксол, доксорубіцин, гемцитабін, гемзар, антрациклін, адриаміцин, інгібітор топоізомерази I, інгібітор топоізомерази II, 5-фторурацил (5-FU), лейковорин, іринотекан) і інгібіторів тирозинкіназних рецепторів (наприклад, ерлотинібу, гефітинібу), інгібітору COX-2 (наприклад, целекоксибу), інгібітору кінази і інгібітору ангіогенезу (включаючи, але не обмежуючись ними, анти-VEGF антитіло або VEGF-пастка); блокатора костимулюючої молекули (включаючи, але не обмежуючись ними, анти-B7.1 антитіло, анти-B7.2 антитіло, CTLA4-Ig, анти-CD20 антитіло), блокатора адгезивної молекули (включаючи, але не обмежуючись ними, анти-LFA-1 антитіло, антитіло проти E/L-селектину і інгібітор невеликої молекули); антитіла проти цитокінів або його функціонального фрагмента (включаючи, але не обмежуючись ними, анти-IL-18 антитіло, анти-TNF антитіло і анти-IL-6 антитіло/антитіло проти рецептора цитокіну), метотрексату, циклоспорину, рапаміцину, FK506, детектованої мітки або репортера, антагоніста TNF, протиревматичного засобу, м'язового релаксantu, наркотичного засобу, нестероїдного протизапального засобу (НСПЗЗ), анагетіку, анестетику, седативного засобу, місцевого анестетику, нейром'язового блокатора, протимікробного засобу, засобу проти псоріазу, кортикостероїду, анаболічного стероїду, еритропоетину, імунізуючого засобу, імуноглобуліну, імунодепресantu, гормону росту, лікарського засобу для гормонозамісної терапії, радіофармацевтичного засобу, антидепресantu, антипсихотичного засобу, стимулятора, протиастматичного лікарського засобу, бета-агоніста, стероїду, що вводиться шляхом інгаляції, епінефрину або його аналога, цитокіну і антагоніста цитокіну.

У переважному варіанті винаходу вищеописані фармацевтичні композиції вводять індивідууму щонайменше одним способом, вибраним з групи, що складається з парентерального введення, підшкірного введення, внутрішньом'язового введення, внутрішньовенного введення, внутрішньосуглобового введення, внутрішньобронхіального введення, внутрішньоочеревинного введення, інтракапсулярного введення, внутрішньохрящового введення, внутрішньопорожнинного введення, внутрішньочеревного введення, внутрішньомозочкового введення, інтрацеребровентрикулярного введення, введення в товсту кишку, інтрацервікального введення, внутрішньошлункового введення, введення в печінку, введення в міокард, внутрішньокісткового введення, внутрішньотазового введення, введення в перикардій, інтраперитонеального введення, інтраплеврального введення, введення в передміхурову залозу, інтрапульмонарного введення, інтаректального введення, внутрішньониркового введення, введення в сітківку ока, інтраспінального введення, введення в синовіальну рідину, введення в грудну клітку, внутрішньоматкового введення, інтравезикулярного введення, введення у вигляді болюсу, вагінального введення, ректального введення, трансбукального введення, під'язикового введення, інтраназального введення і черезшкірного введення.

У іншому аспекті даний винахід стосується щонайменше одного антиідіотипічного анти-DLL4 антитіла проти щонайменше одного DLL4-зв'язувального білка згідно з винаходом. Таким

антиідіотипічним антитілом є будь-яка білок- або пептидвмісна молекула, що включає щонайменше частину молекули імуноглобуліну, таку як, але не обмежується ними, щонайменше одна гіперваріабельна область (область, що визначає комплементарність (CDR)) важкого або легкого ланцюга або її лігандзв'язувальна частина, варіабельна область важкого ланцюга або легкого ланцюга, константна область важкого ланцюга або легкого ланцюга, каркасна область або будь-яка їх частина, які можуть бути включені в зв'язувальний білок згідно з винаходом.

Будь-який з ряду форматів імунодетектуючих аналізів може бути адаптований для використання DLL4-зв'язувального білка згідно з винаходом з метою детектування DLL4 в суміші, в розчині або в біологічному зразку. Такими форматами імунодетектуючих аналізів є, але не обмежуються ними, радіоімуноаналіз (PIA), імунопреципітація, твердофазний імуоферментний аналіз (ELISA), імуоблот-аналіз (наприклад, вестерн-блот-аналіз), імунологічні смужки (наприклад, індикаторні тест-смужки), що містять DLL4-зв'язувальний білок згідно з винаходом, адсорбований або іммобілізований на субстраті, FACS і т. п. Детектування DLL4 з використанням DLL4-зв'язувального білка згідно з винаходом може бути проведене *in vitro* в суміші, в розчині або в біологічному зразку. Біологічними зразками, які можуть бути піддані контактуванню зі зв'язувальним білком згідно з винаходом для детектування DLL4 або для вимірювання його рівня в зразку, є, але не обмежуються ними, сеча, слина, мазок з ротової порожнини (щічний мазок, мазок з язика або із зіву), шкірний мазок, зскрібок зі шкіри, мазок з прямої кишки, вагінальний мазок, проба цільної крові, проба плазми, проба сироватки, біоптат тканини і будь-який інший зразок, взятий у індивідуума відповідно до процедури, відомої фахівцям. У іншому варіанті винаходу DLL4-зв'язувальний білок може бути використаний для детектування DLL4 *in vivo* різними методами томографії і сканування, включаючи, але не обмежуючись ними, рентгенівську комп'ютерну томографію (КТ), магнітно-резонансну томографію (МРТ) і позитронно-емісійну томографію (ПЕТ).

Докладний опис винаходу

Даний винахід стосується DLL4-зв'язувальних білків, зокрема анти-DLL4 антитіл або їх антигензв'язувальних частин, які зв'язуються з DLL4. У різних аспектах даний винахід стосується антитіл і фрагментів антитіл і фармацевтичних композицій, що містять такі антитіла і фрагменти, а також нуклеїнових кислот, рекомбінантних експресійних векторів і клітин-хазяїнів, використовуваних для одержання таких антитіл і фрагментів. У обсяг даного винаходу входять також способи застосування антитіл згідно з винаходом для детектування людського DLL4 або мишачого DLL4, способи інгібування активності людського або мишачого DLL4 і/або людського або мишачого VEGFR2 або VEGFR1, *in vitro* або *in vivo*, і способи регуляції експресії генів.

Якщо це не обумовлено особливо, то всі технічні і наукові терміни, використовувані в даній заявці, мають значення, в основному, зрозумілі середньому фахівцю в галузі, до якої належить винахід. Значення і обсяг термінів повинні бути зрозумілі фахівцям в даній галузі, однак, у випадку виникнення яких-небудь прихованих різночитань, потрібно віддати перевагу визначенням, наданим в даній заявці, а не тим визначенням, які наводяться в словниках або в інших джерелах. Крім того, якщо це не суперечить контексту даного опису, то іменники, застосовувані в однині, можуть означати і іменники у множині, і навпаки. У даній заявці, застосування слова "або" означає "і/або", якщо це не обумовлено особливо. Крім того, термін "який включає", а також інші його форми, такі як "включати" або "включений", є необмежувальними. Такі терміни, як "елемент" або "компонент" охоплюють як елементи, так і компоненти, які включають одну одиницю, і елементи і компоненти, які включають більше ніж одну субоддиницю, якщо це не обумовлено особливо.

У загальних рисах, номенклатура і способи, що стосуються клітин, тканинних культур, молекулярної біології, імунології, мікробіології, генетики, хімії білків і нуклеїнових кислот і гібридизації описаних тут білків і нуклеїнових кислот, добре відомі фахівцям і широко застосовуються в даній галузі. Даний винахід звичайно здійснюють стандартними методами і способами, добре відомими фахівцям і описаними в різних загальних керівництвах і в спеціальній науковій літературі, які цитуються і обговорюються в даному описі, якщо це не вказано особливо. Ферментативні реакції і способи очищення здійснюють відповідно до інструкцій виробників, звичайно рекомендованих фахівцям або запропонованих в даній заявці. Використовувана номенклатура і лабораторні процедури, а також методи аналітичної хімії, хімії органічного синтезу і медичної фармацевтичної хімії, описані в даній заявці, добре відомі і широко застосовуються фахівцями. Для хімічних синтезів, хімічних аналізів, фармацевтичних складів, складів доставки і для лікування пацієнтів застосовуються стандартні методи.

Для кращого розуміння даного винаходу нижче наводяться визначення окремих термінів.

Використовуваний тут термін "поліпептид" означає будь-який полімерний ланцюг з амінокислот. Терміни "пептид" і "білок" є синонімами терміна "поліпептид", а також означають полімерний ланцюг з амінокислот. Термін "поліпептид" охоплює нативні або штучні білки, фрагменти білків і поліпептидні аналоги послідовності білка. Поліпептид може бути мономерним або полімерним. При застосуванні терміна "поліпептид" мається на увазі, що він включає поліпептид і його фрагменти і варіанти (включаючи фрагменти варіантів), якщо це не суперечить контексту винаходу. Що стосується антигенного поліпептиду, то фрагмент поліпептиду містить, але необов'язково, щонайменше один

епітоп з безперервним ланцюгом або нелінійний епітоп поліпептиду. Точні границі щонайменше одного фрагмента епітопа можуть бути визначені середнім фахівцем в даній галузі. Цей фрагмент містить щонайменше приблизно 5 суміжних амінокислот, наприклад щонайменше приблизно 10 суміжних амінокислот, щонайменше приблизно 15 суміжних амінокислот або щонайменше приблизно 20 суміжних амінокислот. Варіанти поліпептиду описані в даній заявці.

Терміни "ізолюваний білок" або "ізолюваний поліпептид" означають білок або поліпептид, які, за своїм походженням або в своєму джерелі, не асоціюються з природними компонентами, разом з якими вони звичайно присутні в своєму природному стані; по суті, не містять інших білків, що походять від одного і того ж виду; експресуються клітиною іншого виду або не існують в природі. Таким чином, поліпептид, який синтезується хімічними методами або синтезується в клітинній системі, відмінний від його природної клітинної системи, буде розглядатися як поліпептид, "ізолюваний" з його природного оточення. Білок може також, по суті, не містити природних компонентів в результаті його виділення методами очищення білка, добре відомими фахівцям.

Використовуваний тут термін "виділення" означає спосіб одержання хімічних молекул, таких як поліпептид, який, по суті, не містить природних компонентів в результаті його виділення, наприклад, методами очищення білка, добре відомими фахівцям.

Використовуваний тут термін "людський DLL4" (скорочено позначуваний тут "hDLL4" або "huDLL4") включає декілька EGF-подібних доменів і домен DSL, необхідні для зв'язування з рецептором. Цей термін включає білок розміром приблизно 74-75 кДа. Структура і виведені послідовності ДНК і послідовності білка людського DLL4 більш детально описані, наприклад, Shutter et al., Genes & Dev., 4: 1313-1318 (2000). Використовуваний тут термін "людський DLL4" також включає рекомбінантний людський DLL4 (rhDLL4), який може бути одержаний стандартними рекомбінантними методами експресії.

Використовуваний тут термін "біологічна активність", якщо він стосується DLL4, означає всі біологічні властивості, характерні для DLL4. Біологічними властивостями DLL4 є, але не обмежуються ними, зв'язування з рецептором Notch, активація рецептора Notch, інгібування передачі сигналу VEGF, пригнічення VEGFR2 і індукування VEGFR1.

Використовувані тут терміни "специфічне зв'язування" або "який специфічно зв'язує", якщо вони стосуються взаємодії антитіла, білка або пептиду з другою хімічною молекулою, означають, що така взаємодія залежить від присутності конкретної структури (наприклад, антигенної детермінанти або епітопа) на хімічній молекулі, так, наприклад, антитіло розпізнає специфічну білкову структуру, а не білки загалом, і зв'язується з цією структурою. Якщо антитіло є специфічним до епітопа "А", то присутність молекули, що містить епітоп А (або вільний немічений А), в реакційній суміші, що включає мічений "А" і антитіло, буде приводити до зниження кількості міченого А, зв'язаного з антитілом.

Використовуваний тут термін "антитіло", в своєму широкому значенні, означає будь-яку молекулу імуноглобуліну (Ig), що складається з чотирьох поліпептидних ланцюгів, двох важких ланцюгів (H) і двох легких ланцюгів (L), або будь-які її функціональні фрагменти, мутанти, варіанти або похідні, що зберігають основні епітопозв'язувальні властивості молекули Ig. Такі типи мутантних, модифікованих або дериватизованих антитіл відомі фахівцям. Необмежувальні варіанти таких антитіл обговорюються нижче.

У повнорозмірному антитілі кожний важкий ланцюг складається з варіабельної області важкого ланцюга (позначуваної тут HCVR або VH) і константної області важкого ланцюга. Константна область важкого ланцюга складається з трьох доменів, CH1, CH2 і CH3. Кожний легкий ланцюг складається з варіабельної області легкого ланцюга (позначуваної тут LCVR або VL) і константної області легкого ланцюга. Константна область легкого ланцюга складається з одного домену, CL. Області VH і VL можуть бути також поділені на гіперваріабельні області, звані областями, що визначають комплементарність (CDR), які чергуються з областями, які є більш консервативними і називаються каркасними областями (FR). Кожна VH і VL складається з трьох CDR і чотирьох FR, розташованих в напрямі від амінокінця до карбоксикінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 і FR4. Молекулами імуноглобуліну можуть бути молекули будь-якого типу (наприклад, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA і IgY), класу (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2) або підкласу.

Термін "Fc-область" використовується для визначення C-кінцевої області важкого ланцюга імуноглобуліну, яка може бути одержана шляхом гідролізу інтактного антитіла папаїном. Fc-областю може бути Fc-область нативної послідовності або Fc-область її варіанта. Fc-область імуноглобуліну звичайно містить два константних домени, домен CH2 і домен CH3, і включає, але необов'язково, домен CH4. Заміни амінокислотних залишків в Fc-частині, що вводяться для зміни ефекторної функції антитіла, відомі фахівцям (патенти США №№ 5648260 і 5624821). Fc-частина антитіла опосередковує декілька важливих ефекторних функцій, наприклад індукування цитокінів, ADCC, фагоцитоз, комплементзалежну цитотоксичність (CDC), час напівжиття/швидкість кліренсу антитіла і утворення комплексів антиген-антитіло. У деяких випадках бажано, щоб терапевтичне антитіло мало ці ефекторні функції, але в інших випадках, залежно від терапевтичного застосування, такі функції можуть бути необов'язковими або навіть небажаними. Деякі ізотипи людських IgG, зокрема IgG1 і

IgG3, опосередковують ADCC і CDC за допомогою зв'язування з FcγR і з комплементом C1q, відповідно. Fc-рецептори у новонароджених (FcRn) являють собою важливі компоненти, що визначають час напівжиття антитіл в кровотоці. У іншому варіанті винаходу щонайменше один амінокислотний залишок в константній області антитіла, наприклад в Fc-області антитіла, замінюють так, щоб це приводило до зміни ефекторних функцій антитіла. Димеризація двох ідентичних важких ланцюгів імуноглобуліну опосередковується димеризацією доменів CH3 і стабілізується дисульфідними зв'язками в шарнірній області (Huber et al., *Nature*; 264: 415-420 (1976); Thies et al., *J. Mol. Biol.*; 293: 67-79 (1999)). Мутація цистеїнових залишків в шарнірних областях, що проводиться з метою запобігання утворенню дисульфідних зв'язків між важкими ланцюгами, буде дестабілізувати димеризацію доменів CH3. Були ідентифіковані залишки, відповідальні за димеризацію CH3 (Dall'Acqua *Biochem.* 37: 9266-9273 (1998)). Тому це дає можливість одержати одновалентну половину Ig. Цікаво зазначити, що такі одновалентні молекули, що становлять половину Ig, були виявлені в природі для імуноглобулінів підкласів IgG і IgA (Seligman, *Ann. Immunol.* 129: 855-70 (1978); Biewenga et al., *Clin Exp Immunol* 51:395-400 (1983)). Стехіометрія Fc-області FcRn:Ig, як було визначено, становить 2:1 (West et al., *Biochem.* 39: 9698-9708 (2000)), і половина Fc є достатньою для опосередковування зв'язування з FcRn (Kim et al., *Eur. J. Immunol.*; 24: 542-548 (1994)). Мутації, що вводяться для порушення димеризації домену CH3, більше не зможуть негативно впливати на зв'язування з FcRn, оскільки залишки, що грають важливу роль в димеризації CH3, розташовані на внутрішній поверхні β-складчастої структури CH3, а область, відповідальна за зв'язування з FcRn, розташована за межами границі доменів CH2-CH3. Однак половина молекул Ig може мати певну перевагу з точки зору проникнення в тканину, що зумовлено її меншим розміром в порівнянні із звичайним антитілом. У одному з варіантів винаходу щонайменше один амінокислотний залишок в константній області зв'язувального білка згідно з винаходом, наприклад в Fc-області, замінюють так, щоб це приводило до зміни димеризації важких ланцюгів і до утворення половинних молекул Ig. Протизапальна активність IgG повністю залежить від сіалілування N-зв'язаного глікану Fc-фрагмента IgG. Було визначено, що присутність глікану є обов'язковою умовою для надання протизапальної активності, оскільки його присутність дозволяє створити відповідний Fc-фрагмент IgG1 і, тим самим, одержати повністю рекомбінантний сіалілований Fc-фрагмент IgG1 зі значно більш високою активністю (Anthony et al., *Science* 320: 373-376 (2008)).

Використовуваний тут термін "антигензв'язувальна частина" антитіла (або просто "частина антитіла") означає один або декілька фрагментів антитіла, які зберігають здатність специфічно зв'язуватися з антигеном (тобто з конкретним епітопом антигену, таким як епітоп DLL4). Було показано, що антигензв'язувальна функція антитіла може бути реалізована завдяки фрагментам повнорозмірного антитіла. Такі варіанти антитіл можуть бути також біспецифічними, мати "подвійну" специфічність або бути мультиспецифічними, тобто специфічно зв'язуватися з двома або більше різними антигенами (або з двома або більше різними епітопами на одному і тому ж антигені). Прикладами фрагментів, що зв'язуються, які входять в обсяг терміна "антигензв'язувальна частина" антитіла, є (i) Fab-фрагмент, одновалентний фрагмент, що складається з доменів VL, VH, CL і CH1; (ii) F(ab')₂-фрагмент, двовалентний фрагмент, що включає два Fab-фрагменти, зв'язані дисульфідним містком в шарнірній області; (iii) Fd-фрагмент, що складається з доменів VH і CH1; (iv) Fv-фрагмент, що складається з доменів VL і VH одного плеча антитіла; (v) dAb-фрагмент (Ward et al., *Nature* 341: 544-546 (1989); публікація PCT WO 90/05144A1), який містить один варіабельний домен; і (vi) ізольована гіперваріабельна область (CDR). Крім того, хоч два домени Fv-фрагмента, VL і VH, кодується окремими генами, однак, вони можуть бути приєднані один до одного рекомбінантними методами за допомогою синтетичного лінкера, який дозволяє створити один білковий ланцюг, де області VL і VH спарюються, утворюючи одновалентні молекули (відомі як одноланцюжковий Fv (scFv); див. наприклад, Bird et al., *Science* 242: 423-426 (1988); і Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85: 5879-5883 (1988)). Такі одноланцюжкові антитіла також входять в обсяг терміна "антигензв'язувальна частина" антитіла. У обсяг цього терміна також входять і інші форми одноланцюжкових антитіл, таких як діантитіла. Діантитіла являють собою двовалентні біспецифічні антитіла, в яких домени VH і VL експресуються на одному поліпептидному ланцюгу, але сполучені за допомогою лінкера, який є дуже коротким для утворення пари між двома доменами на одному і тому ж ланцюгу, а тому домени вимушені спарюватися з комплементарними доменами іншого ланцюга і утворювати два антигензв'язувальних сайти (див., наприклад, Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90: 6444-6448 (1993); Poljak R.J., *Structure* 2:1121-1123 (1994)). Такі антигензв'язувальні частини антитіла відомі фахівцям (Kontermann & Dubel eds., *Antibody Engineering*. Springer-Verlag. New York, 2001 p. 790 (ISBN 3-540-41354-5)). Крім того, одноланцюжковими антитілами також є "лінійні антитіла", що містять пару тандемних Fv-сегментів (VH-CH1-VH-CH1), які, разом з комплементарними поліпептидами легкого ланцюга, утворюють пару антигензв'язувальних областей (Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 (1995); і патент США № 5641870).

Використовуваний тут термін "конструкція антитіла" (або "конструкція анти-DLL4 антитіла") означає поліпептид, що містить одну або декілька антигензв'язувальних частин згідно з винаходом, зв'язаних з

лінкерним поліпептидом або з константним доменом імуноглобуліну. Лінкерні поліпептиди містять два або більше амінокислотних залишків, зв'язаних пептидними зв'язками, і використовуються для зв'язування з однією або декількома антигензв'язувальними частинами. Такі лінкерні поліпептиди добре відомі фахівцям (див., наприклад, Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993); Poljak R.J., Structure, 2: 1121-1123 (1994)). Термін "константний домен імуноглобуліну" означає константний домен важкого або легкого ланцюга. Амінокислотні послідовності константного домену важкого і легкого ланцюгів людського IgG відомі фахівцям і представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Послідовність константного домену важкого ланцюга людського IgG і константного домену легкого ланцюга людського IgG

Блок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
		12345678901234567890123456789012
Константна область Ig-гамма 1	SEQ ID NO: 2	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
		12345678901234567890123456789012
		QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Мутантна константна область Ig-гамма 1	SEQ ID NO: 3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Константна область Ig каппа	SEQ ID NO: 4	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNFFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNREGEC
Константна область Ig лямбда	SEQ ID NO: 5	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

Крім того, антитіло або його антигензв'язувальна частина можуть бути частиною більш великих імуноадгезивних молекул, утворених за допомогою ковалентного або нековалентного зв'язування даного антитіла або його антигензв'язувальної частини з одним або декількома іншими білками або пептидами. Прикладами таких імуноадгезивних молекул є корова область стрептавідину, використовувана для одержання тетрамерної молекули scFv (Kipriyanov et al., Human Antibodies and Hybridomas, 6: 93-101 (1995)), цистеїновий залишок, маркерний пептид і С-кінцева поліпептидна мітка, використовувана для одержання двовалентних і біотинільованих молекул scFv (Kipriyanov et al., Mol. Immunol, 31: 1047-1058 (1994)). Частини антитіл, такі як Fab- і F(ab')₂-фрагменти, можуть бути одержані з цілих антитіл стандартними методами, такими як гідроліз цілих антитіл папаїном або пепсином, відповідно. Крім того, антитіла, частини антитіл і імуноадгезивні молекули можуть бути одержані стандартними методами рекомбінантних ДНК, описаними в даній заявці і відомими в даній галузі техніки.

Використовуваний тут термін "ізольоване антитіло" означає антитіло, яке, по суті, не містить інші антитіла, що мають різні специфічності до антигену (наприклад, ізольоване антитіло, яке специфічно

зв'язується з hDLL4, в основному, ізольоване від антитіл, які специфічно зв'язуються з антигенами, що не є hDLL4). Однак ізольоване антитіло, яке специфічно зв'язується з hDLL4, може перехресно реагувати з іншими антигенами, такими як молекули DLL4, що походять від інших видів (наприклад, muDLL4). Крім того, ізольоване антитіло може бути, в основному, відділене від іншого клітинного матеріалу і/або інших хімічних речовин.

Використовуваний тут термін "моноклональне антитіло" або скорочено "Mab" і "mAb" означає антитіло, одержане від популяції, в основному, гомогенних антитіл, тобто окремих антитіл, що складають дану популяцію, які є ідентичними за винятком антитіл з можливими природними мутаціями, які можуть бути присутніми в невеликих кількостях. Моноклональні антитіла є високою мірою специфічними і направлені проти одного антигену. Крім того, на відміну від складів поліклональних антитіл, які звичайно включають різні антитіла, направлені проти різних детермінант (епітопів), кожне mAb направлене проти однієї детермінанти на антигені. Визначення "моноклональний" не означає, що дане антитіло повинно бути продуковане яким-небудь конкретним методом.

Використовуваний тут термін "людське антитіло" включає антитіла, які мають варіабельні і константні області, що походять від послідовностей імунoglobуліну людської зародкової лінії. Людські антитіла згідно з винаходом можуть включати амінокислотні залишки, що не належать до послідовностей імунoglobуліну людської зародкової лінії (наприклад, в них можуть бути введені мутації за допомогою неспецифічного або сайт-специфічного мутагенезу *in vitro* або за допомогою соматичної мутації *in vivo*), наприклад, такі залишки можуть бути присутніми в CDR, зокрема в CDR3. Однак використовуваний тут термін "людське антитіло" не включає антитіла, в яких послідовності CDR, що походять від зародкової лінії ссавців інших видів, таких як миша, були приєднані до людських каркасних послідовностей.

Використовуваний тут термін "рекомбінантне людське антитіло" включає всі людські антитіла, які були одержані, експресовані, сконструйовані або виділені рекомбінантними методами, наприклад антитіла, експресовані з використанням рекомбінантного експресійного вектора, трансфікованого в клітину-хазіяїна, антитіла, виділені з бібліотеки рекомбінантних комбінаторних людських антитіл (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)), антитіла, виділені у тварин (наприклад, мишей), які є трансгенними відносно генів людського імунoglobуліну (див. Taylor et al., Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295 (1992); Kellermann & Green, Curr. Opin. Biotechnol. 13: 593-597 (2002); Little et al., Immunol. Today 21: 364-370 (2000)), або антитіла, які були одержані, експресовані, сконструйовані або виділені іншими методами, що включають сплайсинг послідовностей генів людського імунoglobуліну з утворенням інших послідовностей ДНК. Такі рекомбінантні людські антитіла мають варіабельні і константні області, що походять від послідовностей імунoglobуліну людської зародкової лінії. Однак, в деяких варіантах винаходу, такі рекомбінантні людські антитіла піддають мутагенезу *in vitro* (або, якщо використовується тварина, яка є трансгенною відносно послідовності людського Ig, її піддають соматичному мутагенезу *in vivo*), і, таким чином, амінокислотні послідовності областей VH і VL рекомбінантних антитіл являють собою послідовності, які, якщо вони походять від послідовностей VH і VL людської зародкової лінії і є спорідненими з цими послідовностями, звичайно не входять в репертуар людських антитіл зародкової лінії *in vivo*.

Термін "химерне антитіло" означає антитіла, які містять послідовності варіабельної області важкого і легкого ланцюгів, що походять від одного виду, і послідовності константної області, що походять від інших видів, такі як антитіла, що мають мишачі варіабельні області важкого і легкого ланцюгів, приєднані до людських константних областей.

Використовуваний тут термін "CDR" означає гіперваріабельну область у варіабельних послідовностях антитіла. У кожній з варіабельних областей важкого ланцюга і легкого ланцюга присутні три CDR, які, для кожної варіабельної області, позначаються CDR1, CDR2 і CDR3. Використовуваний тут термін "набір CDR" означає групу з трьох CDR, які присутні в одній варіабельній області, що має здатність зв'язуватися з антигеном. Точні границі цих CDR були визначені різним чином залежно від різних систем. Система, описана Кебатом (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) і (1991)), має не тільки однозначну систему нумерації залишків, застосовану до будь-якої варіабельної області антитіла, але також і точні границі залишків, що визначають три CDR. Ці CDR можуть називатися "CDR по Кебату". Чотія і співробітники (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987) і Chothia et al., Nature 342: 877-883 (1989)) виявили, що деякі субположення в CDR по Кебату набувають майже ідентичної конформації пептидного кістяка, незважаючи на те, що вони мають значні відмінності на рівні амінокислотної послідовності. Такі підобласті були позначені "L1", "L2" і "L3" або "H1", "H2" і "H3", де "L" і "H" означають області легкого і важкого ланцюгів, відповідно. Такі області, які мають границі, що перекриваються з CDR по Кебату, можуть називатися "CDR по Чотіа". Інші границі, що визначають перекривання CDR з CDR по Кебату, були описані в публікації Padlan, FASEB J. 9: 133-139 (1995) і

MacCallum, J. Mol. Biol. 262(5): 732-45 (1996). Інші визначення границь CDR можуть, але не суворо, відповідати одній з описаних тут систем, але проте ці границі перекриваються з CDR по Кебату, хоч ці області можуть бути коротшими або довгими, ніж це було передбачено або одержано з експериментальних даних, які вказують на те, що конкретні залишки або групи залишків або навіть повнорозмірні CDR не здійснюють значного впливу на зв'язування з антигеном. У описаних тут способах можуть використовуватися CDR, визначені відповідно до будь-якої з цих систем, хоч в деяких варіантах використовуються CDR, визначені по Кебату або Чотіа.

Використовувані тут терміни "нумерація по Кебату", "визначення по Кебату" і "мічення по Кебату" є синонімами. Ці терміни, відомі фахівцям, означають систему нумерації амінокислотних залишків, які є більш варіабельними (тобто гіперваріабельними), ніж інші амінокислотні залишки у варіабельних областях важкого і легкого ланцюгів антитіла або його антигензв'язувальної частини (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 № 91-3242 (1991)). Для варіабельної області важкого ланцюга (VH) гіперваріабельна область простягається в межах від амінокислотного положення 31 до амінокислотного положення 35 для CDR1, від амінокислотного положення 50 до амінокислотного положення 65 для CDR2, і від амінокислотного положення 95 до амінокислотного положення 102 для CDR3. Для варіабельної області легкого ланцюга (VL) гіперваріабельна область простягається в межах від амінокислотного положення 24 до амінокислотного положення 34 для CDR1, від амінокислотного положення 50 до амінокислотного положення 56 для CDR2, і від амінокислотного положення 89 до амінокислотного положення 97 для CDR3.

За останні 20 років спостерігається збільшення загальнодоступних баз даних і даних аналізу наявних в них амінокислотних послідовностей варіабельних областей важких і легких ланцюгів, що дозволяє фахівцям визначити типові граничні області між каркасними областями (FR) і послідовностями CDR, присутніми в послідовностях варіабельних областей, і точно ідентифікувати CDR відповідно до нумерації по Кебату, нумерації по Чотіа або відповідно до інших систем нумерації. Див., наприклад, Martin. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains", Kontermann and Dübel, eds., Antibody Engineering (Springer-Verlag, Berlin, 2001), розділ 31, сторінки 432-433. Нижче наводиться приданий метод визначення амінокислотних послідовностей CDR по Кебату, присутніх в амінокислотних послідовностях варіабельних областей важкого ланцюга (VH) і легкого ланцюга (VL):

Ідентифікація амінокислотної послідовності CDR-L1:

приблизно перші 24 амінокислотних залишки від амінокінця області VL;

залишком перед послідовністю CDR-L1 завжди є цистеїн (C);

залишком після послідовності CDR-L1 завжди є триптофан (W), звичайно Trp-Tyr-Gln (W-Y-Q), але також і Trp-Leu-Gln (W-L-Q), Trp-Phe-Gln (W-F-Q) і Trp-Tyr-Leu (W-Y-L);

довжина звичайно складає від 10 до 17 амінокислотних залишків.

Ідентифікація амінокислотної послідовності CDR-L2:

завжди перші 16 залишків після CDR-L1;

залишками перед послідовністю CDR-L2 звичайно є Ile-Tyr (I-Y), але також і Val-Tyr (V-Y), Ile-Lys (I-K) і Ile-Phe (I-F);

довжина завжди становить 7 амінокислотних залишків.

Ідентифікація амінокислотної послідовності CDR-L3:

завжди перші 33 амінокислоти після CDR-L2;

залишком перед амінокислотою послідовністю CDR-L3 завжди є цистеїн (C);

залишками після послідовностями завжди є Phe-Gly-X-Gly (F-G-X-G) (SEQ ID NO: 374), де X являє собою будь-яку амінокислоту;

довжина звичайно складає від 7 до 11 амінокислотних залишків.

Ідентифікація амінокислотної послідовності CDR-H1:

приблизно перші 33 амінокислотних залишки від амінокінця області VH і завжди 9 залишків після цистеїну (C);

залишками перед послідовністю завжди є Cys-X-X-X-X-X-X-X (SEQ ID NO: 375), де X являє собою будь-яку амінокислоту;

залишком після послідовності завжди є Trp (W), звичайне Trp-Val (W-V), але також і Trp-Ile (W-I) і Trp-Ala (W-A);

довжина звичайно складає від 5 до 7 амінокислотних залишків.

Ідентифікація амінокислотної послідовності CDR-H2:

завжди перші 15 амінокислотних залишків після CDR-H1;

залишками перед послідовністю звичайно є Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (L-E-W-I-G) (SEQ ID NO: 376), але можливі також і інші варіанти;

залишками після послідовності є Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala (K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A);

довжина звичайно складає від 16 до 19 амінокислотних залишків.

Ідентифікація амінокислотної послідовності CDR-H3:

завжди перші 33 амінокислотних залишки після CDR-H2 і завжди 3 залишки після цистеїну (C);

залишками перед послідовністю завжди є Cys-X-X(C-X-X), де X являє собою будь-яку амінокислоту, а звичайно Cys-Ala-Arg (C-A-R);

залишками після послідовності завжди є Trp-Gly-X-Gly (W-G-X-G) (SEQ ID NO: 377), де X являє собою будь-яку амінокислоту;

довжина звичайно складає від 3 до 25 амінокислотних залишків.

Термін "CDR-прищеплене антитіло" означає антитіла, які містять послідовності варіабельної області важкого і легкого ланцюгів, які походять від одного виду, але в яких послідовності однієї або декількох CDR-областей VH і/або VL замінені послідовностями CDR інших видів, наприклад, такі антитіла мають мишачі варіабельні області важкого і легкого ланцюгів, в яких одна або декілька мишачих CDR (наприклад, CDR3) були замінені людськими послідовностями CDR.

Термін "гуманізоване антитіло" означає антитіла, які містять послідовності варіабельної області важкого і легкого ланцюгів, що походять від ссавців, що не є людиною (наприклад, миші), але в яких щонайменше частина послідовності VH і/або VL була модифікована для надання їй більшої схожості з послідовністю людського антитіла, тобто більшої схожості з варіабельними послідовностями людської зародкової лінії. "Гуманізоване антитіло" являє собою антитіло або його варіант, похідне, аналог або фрагмент, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном, що представляє інтерес, і містять каркасну область (FR), що має, в основному, амінокислотну послідовність людського антитіла і гіперваріабельну область (CDR), що має, в основному, амінокислотну послідовність нелюдського антитіла. Використовуваний тут термін "в основному", що стосується CDR, означає, що CDR має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, щонайменше на 98% або щонайменше на 99% ідентична амінокислотній послідовності CDR нелюдського антитіла. Гуманізоване антитіло включає в основному всі або щонайменше один, а звичайно два варіабельних домени (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv), в яких всі або в основному всі області CDR відповідають нелюдському імуноглобуліну (тобто донорному антитілу), а всі або в основному всі каркасні області являють собою області, що мають консенсусну послідовність людського імуноглобуліну. У одному з варіантів винаходу гуманізоване антитіло також містить щонайменше частину константної області імуноглобуліну (Fc), а звичайно людського імуноглобуліну. У деяких варіантах винаходу гуманізоване антитіло містить легкий ланцюг, а також щонайменше варіабельний домен важкого ланцюга. Таке антитіло також може включати області CH1, шарнірну область і області CH2, CH3 і CH4 важкого ланцюга. У деяких варіантах винаходу гуманізоване антитіло містить тільки гуманізований легкий ланцюг. У деяких варіантах винаходу гуманізоване антитіло містить тільки гуманізований важкий ланцюг. У конкретних варіантах винаходу гуманізоване антитіло містить тільки гуманізований варіабельний домен легкого ланцюга і/або гуманізований важкий ланцюг.

Гуманізоване антитіло може бути вибрано з імуноглобулінів будь-якого класу, включаючи IgM, IgG, IgD, IgA і IgE, і будь-якого ізотипу, включаючи, але не обмежуючись ними, IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Гуманізоване антитіло може містити послідовності, що походять від антитіл більше ніж одного класу або ізотипу, а конкретні константні домени можуть бути вибрані для оптимізації потрібних ефекторних функцій методами, добре відомими фахівцям.

Каркасні області і CDR гуманізованого антитіла необов'язково повинні точно відповідати батьківським послідовностям, так, наприклад, CDR донорного антитіла або консенсусна каркасна область можуть бути піддані мутагенезу шляхом заміни, інсерції і/або делеції щонайменше одного амінокислотного залишку так, щоб CDR або каркасний залишок в цьому сайті не відповідав залишку донорного антитіла або консенсусній каркасній області. Однак, в переважному варіанті винаходу, такі мутації не повинні бути надмірними. Звичайно залишки гуманізованого антитіла щонайменше на 80%, переважно щонайменше на 85%, більш переважно щонайменше на 90%, а найбільш переважно щонайменше на 95% відповідають залишкам послідовностей батьківських FR і CDR. Використовуваний тут термін "консенсусна каркасна область" означає каркасну область в консенсусній послідовності імуноглобуліну. Використовуваний тут термін "консенсусна послідовність імуноглобуліну" означає послідовність, що походить від амінокислот, що найчастіше зустрічаються (або нуклеотидів), в сімействі споріднених послідовностей імуноглобуліну (див., наприклад, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987)). "Консенсусна послідовність імуноглобуліну" може також містити "консенсусну(i) каркасну(i) область(i)" і/або "консенсусну(i) CDR". У сімействі імуноглобулінів кожне положення в консенсусній послідовності зайняте амінокислотою, що найчастіше зустрічається в цьому положенні вказаного сімейства. Якщо дві амінокислоти зустрічаються з однаковою частотою, то в консенсусній послідовності може бути присутньою будь-яка з цих амінокислот.

"Афінно зрілим" антитілом є антитіло, яке має одну або декілька модифікацій в одній або декількох CDR, які приводять до підвищення афінності антитіла до антигену-мішені, на відміну від батьківського

антитіла, що не має такої(их) модифікації(й). Репрезентативні афінно зрілі антитіла мають наномольярну або навіть пікомольярну афінність відносно антигену-мішені. Афінно зрілі антитіла одержують різними методами, відомими фахівцям. У публікації Marks et al., *BioTechnology*, 10: 779-783 (1992), описане афінне дозрівання, що досягається за допомогою перестановки доменів VH і VL. Неспецифічний мутагенез CDR і/або каркасних залишків описаний в публікаціях: 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). Селективна мутація в селективних положеннях мутагенезу і контактування або гіпермутація із заміною амінокислотним залишком, що підвищує активність, описано в патенті США US6914128B1.

Термін "полівалентний зв'язувальний білок" означає зв'язувальний білок, що містить два або більше антигензв'язувальних сайтів (також званих тут "антигензв'язувальними доменами"). Полівалентний зв'язувальний білок переважно конструюють так, щоб він містив три або більше антигензв'язувальних сайтів і, по суті, не був природним антитілом. Термін "мультиспецифічний зв'язувальний білок" означає зв'язувальний білок, який здатний зв'язуватися з двома або більше спорідненими або неспорідненими мішенями, включаючи зв'язувальний білок, який здатний зв'язуватися з двома або більше різними епітопами однієї і тієї ж молекули-мішені.

Використовуваний тут термін "біспецифічне антитіло" означає повнорозмірні антитіла, які одержують із застосуванням квадронової технології (див. Milstein et al., *Nature*, 305(5934): 537-540 (1983)), хімічного кон'югування двох різних моноклональних антитіл (див. Staerz et al., *Nature*, 314(6012): 628-631 (1985)) або із застосуванням технології "вузли в дірках" або аналогічних технологій, які дозволяють вводити мутації в Fc-область (див. Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(14): 6444-6448 (1993)), що приводить до одержання множини різних молекул імуноглобуліну, з яких тільки одна молекула є функціональним біспецифічним антитілом. Завдяки своїй молекулярній функції, біспецифічне антитіло зв'язується з одним антигеном (або епітопом) на одній з двох гілок, що зв'язуються (одна пара HC/LC), і з іншим антигеном (або епітопом) на другій гілці (інша пара HC/LC). Згідно з таким визначенням, біспецифічне антитіло має дві окремих антигензв'язувальних гілки (відмінні по специфічності і по послідовностях CDR) і є одновалентним для кожного антигену, з яким воно зв'язується.

Використовуваний тут термін "антитіло з подвійною специфічністю" означає повнорозмірні антитіла, які можуть зв'язуватися з двома різними антигенами (або епітопами) в кожній зі своїх двох гілок, що зв'язуються (пара HC/LC) (див. публікацію заявки PCT WO 02/02773). Відповідно до цього, зв'язувальний білок з подвійною специфічністю має дві ідентичних антигензв'язувальних гілки з ідентичною специфічністю і ідентичними послідовностями CDR і є двовалентним для кожного антигену, з яким він зв'язується.

Білки, що зв'язуються "з двома варіабельними доменами" ("DVD") згідно з винаходом містять два або більше антигензв'язувальних сайтів і можуть являти собою двовалентні білки, що зв'язуються (з двома антигензв'язувальними сайтами), чотиривалентні білки, що зв'язуються (з чотирма антигензв'язувальними сайтами), або полівалентні білки, що зв'язуються. DVD можуть бути моноспецифічними, тобто вони можуть зв'язуватися з одним антигеном (або з одним специфічним епітопом), або мультиспецифічними, тобто вони можуть зв'язуватися з двома або більше антигенами (тобто з двома або більше епітопами однієї і тієї ж молекули антигену-мішені або з двома або більше епітопами різних антигенів-мішеней). Переважний зв'язувальний DVD-білок містить два DVD-поліпептиди важкого ланцюга і два DVD-поліпептиди легкого ланцюга і називається "DVD-імуноглобуліном" або "DVD-Ig". Тому такий зв'язувальний білок DVD-Ig є тетрамерним і нагадує молекулу IgG, але має більшу кількість антигензв'язувальних сайтів, ніж молекула IgG. Таким чином, кожна половина тетрамерної молекули DVD-Ig нагадує одну половину молекули IgG і включає DVD-поліпептид важкого ланцюга і DVD-поліпептид легкого ланцюга, але на відміну від пари важкого і легкого ланцюгів молекули IgG, яка має один антигензв'язувальний домен, пара важкого і легкого ланцюгів молекули DVD-Ig має два або більше антигензв'язувальних сайтів.

Кожний антигензв'язувальний сайт зв'язувального білка DVD-Ig походить від донорного ("батьківського") моноклонального антитіла, а тому містить варіабельний домен важкого ланцюга (VH) і варіабельний домен легкого ланцюга (VL), де загальне число CDR, що беруть участь в зв'язуванні з антигеном, в кожному антигензв'язувальному сайті дорівнює шести. Відповідно до цього, зв'язувальний білок DVD-Ig, який зв'язується з двома різними епітопами (тобто з двома різними епітопами двох різних молекул антигенів або з двома різними епітопами однієї і тієї ж молекули антигену), містить антигензв'язувальний сайт, що походить від першого батьківського моноклонального антитіла, і антигензв'язувальний сайт, що походить від другого батьківського моноклонального антитіла.

Опис конструювання і експресії, а також характеристика молекул DVD-Ig, що зв'язуються, наводиться в публікації заявки PCT № WO 2007/024715, в патенті США № 7612181 і в публікації Wu et al., *Nature Biotech.*, 25: 1290-1297 (2007). Переважним прикладом таких молекул DVD-Ig є молекули,

які містять важкий ланцюг, що має структурну формулу $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, де $VD1$ являє собою перший варіабельний домен важкого ланцюга, $VD2$ являє собою другий варіабельний домен важкого ланцюга, C являє собою константний домен важкого ланцюга, $X1$ являє собою лінкер, за умови, що він не є $CH1$, $X2$ являє собою Fc -область, а n дорівнює 0 або 1, а переважно 1; і легкий ланцюг, що має структурну формулу $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, де $VD1$ являє собою перший варіабельний домен легкого ланцюга, $VD2$ являє собою другий варіабельний домен легкого ланцюга, C являє собою константний домен легкого ланцюга, $X1$ являє собою лінкер, за умови, що він не є $CH1$, а $X2$ не містить Fc -області, n дорівнює 0 або 1, а переважно 1. Такий DVD-Ig може містити два вказаних важких ланцюги і два вказаних легких ланцюги, де кожний з цих ланцюгів містить варіабельні домени, тандемно приєднані один до одного без проміжної константної області, звичайно присутньої між варіабельними областями, де важкий ланцюг і легкий ланцюг зв'язані один з одним і утворюють тандемні функціональні антигензв'язувальні сайти, а пара важкого і легкого ланцюгів може бути зв'язана з іншою парою важкого і легкого ланцюгів з утворенням тетрамерного зв'язувального білка, що має чотири функціональних антигензв'язувальних сайти. У іншому прикладі молекула DVD-Ig може містити важкий і легкий ланцюги, кожний з яких включає три варіабельних домени ($VD1$, $VD2$, $VD3$), тандемно приєднані один до одного без проміжної константної області, звичайно присутньої між варіабельними областями, де важкий і легкий ланцюги можуть бути зв'язані один з одним і утворюють три антигензв'язувальних сайти, а пара важкого і легкого ланцюгів може бути зв'язана з іншою парою важкого і легкого ланцюгів з утворенням тетрамерного зв'язувального білка, що має шість антигензв'язувальних сайтів.

У переважному варіанті винаходу зв'язувальний білок DVD-Ig згідно з винаходом не тільки здатний зв'язуватися з одними і тими ж молекулами-мішенями, зв'язаними з батьківськими моноклональними антитілами, але також має одну або декілька потрібних властивостей, які мають одне або декілька батьківських моноклональних антитіл. Переважно, такою додатковою властивістю є властивість антитіла, характерна одному або декільком батьківським моноклональним антитілам. Властивостями антитіл, які можуть бути надані зв'язувальному білку DVD-Ig одним або декількома батьківськими моноклональними антитілами, є, але не обмежуються ними, специфічність до антигену, афінність до антигену, активність, біологічна функція, розпізнавання епітопа, стабільність білка, розчинність білка, ефективність продукування, імуногенність, фармакокінетичні властивості, біологічна доступність, здатність перехресно реагувати з тканинами і здатність до зв'язування з ортологічним антигеном.

Зв'язувальний білок DVD-Ig згідно з винаходом зв'язується щонайменше з одним епітопом людського білка DLL4. Необмежувальними прикладами зв'язувального білка DVD-Ig згідно з винаходом є зв'язувальний білок DVD-Ig, який зв'язується з одним або декількома епітопами людського DLL4; зв'язувальний білок DVD-Ig, який зв'язується з епітопом людського DLL4 і з епітопом DLL4 інших видів (наприклад, миші); і зв'язувальний білок DVD-Ig, який зв'язується з епітопом людського DLL4 і з епітопом іншої молекули-мішені (наприклад, VEGFR2 або VEGFR1).

"Функціональний антигензв'язувальний сайт" зв'язувального білка являє собою сайт, здатний зв'язуватися з антигеном-мішенню. Афінність зв'язування антигензв'язувального сайту з антигеном необов'язково повинна бути такою ж високою, як і афінність батьківського антитіла, від якого походить антигензв'язувальний сайт, однак здатність зв'язуватися з антигеном повинна бути детектованою будь-яким з різних методів, звичайно застосовуваних для оцінки зв'язування антитіла з антигеном. Крім того, афінності зв'язування кожного антигензв'язувального сайту полівалентного антитіла з антигеном необов'язково повинні бути кількісно рівноцінними.

Використовувані тут терміни "акцептор" і "акцепторне антитіло" означають антитіло або послідовність нуклеїнової кислоти, які містять або кодують, відповідно, щонайменше 80%, щонайменше 85%, щонайменше 90%, щонайменше 95%, щонайменше 98% або 100% від всіх амінокислотних послідовностей однієї або декількох каркасних областей (FR). У деяких варіантах винаходу термін "акцептор" означає амінокислотну послідовність або нуклеотидну послідовність антитіла, яка включає або кодує, відповідно, константну(і) область(і). У іншому варіанті винаходу термін "акцептор" означає амінокислотну послідовність або нуклеотидну послідовність антитіла, яка містить або кодує, відповідно, одну або декілька каркасних областей і константних областей. У конкретному варіанті винаходу термін "акцептор" означає амінокислотну послідовність або нуклеотидну послідовність людського антитіла, що містить або кодує, відповідно, щонайменше 80%, щонайменше 85%, щонайменше 90%, щонайменше 95%, щонайменше 98% або 100% від всіх амінокислотних послідовностей однієї або декількох каркасних областей. Відповідно до цього варіанта, акцептор може містити щонайменше 1, щонайменше 2, щонайменше 3, щонайменше 4, щонайменше 5 або щонайменше 10 амінокислотних залишків, які не присутні в одному або декількох конкретних положеннях людського антитіла. Акцепторна каркасна область і/або акцепторна(і) константна(і) область(і) можуть, наприклад, походити або можуть бути одержані з гена антитіла зародкової лінії, гена зрілого антитіла і функціонального антитіла (наприклад, антитіл, добре відомих фахівцям, антитіл, що знаходяться на стадії конструювання, або комерційно доступних антитіл).

Використовуваний тут термін "канонічний" залишок означає залишок в CDR або каркасній області,

який визначає конкретну канонічну структуру CDR, визначену Чотіа і ін. (див. публікації Chothia et al., J. Mol. Biol, 196: 901-917 (1987); Chothia et al., J. Mol. Biol, 227: 799-817 (1992), які вводяться в даний опис за допомогою посилання). Відповідно до опису Чотіа і ін., положення CDR багатьох антитіл, що грають важливу роль, мають майже ідентичну конформацію пептидного кістяка, незважаючи на значну варіабельність на рівні амінокислотних послідовностей. Кожна канонічна структура визначає, головним чином, серію кутів закручування пептидного кістяка для безперервного сегмента з амінокислотних залишків, що створюють петлю.

Використовувані тут терміни "донор" і "донорне антитіло" означають антитіло, що містить одну або декілька CDR. У переважному варіанті винаходу донорним антитілом є антитіло, що походить від видів, відмінних від тих видів, від яких були одержані або від яких походять каркасні області антитіла. Термін "донорне антитіло", якщо він належить до гуманізованого антитіла, означає нелюдське антитіло, що має одну або декілька CDR.

Використовувані тут терміни "каркасна область" або "каркасна послідовність" означають інші послідовності варіабельної області мінус CDR. Оскільки точне визначення послідовності CDR може бути надане, виходячи з інших систем (наприклад, див. вище), то термін "каркасна послідовність" може мати, відповідно, іншу інтерпретацію. Шість CDR (CDR-L1, -L2 і -L3 легкого ланцюга і CDR-H1, -H2 і -H3 важкого ланцюга) також розділяють каркасні області в легкому ланцюзі і у важкому ланцюзі на чотири підобласті (FR1, FR2, FR3 і FR4) на кожному ланцюзі, де CDR1 розташована між FR1 і FR2, CDR2 розташована між FR2 і FR3, і CDR3 розташована між FR3 і FR4. Не претендуючи на точне визначення конкретних підобластей, таких як FR1, FR2, FR3 або FR4, можна також сказати, що каркасна область являє собою об'єднані FR у варіабельній області в одному природному ланцюзі імуноглобуліну. Використовуваний тут термін "область FR" означає одну з чотирьох підобластей, а термін "області FR" означає дві або декілька з чотирьох підобластей, що складають каркасну область.

Послідовності акцепторних людських важких і легких ланцюгів відомі фахівцям. У одному з варіантів винаходу послідовності акцепторних людських важких і легких ланцюгів вибрані з послідовностей, представлених в таблицях 2 і 3.

Таблица 2

Акцепторні послідовності важкого ланцюга

SEQ ID NO.:	Область білка/ близькоспоріднене сімейство зародкової лінії	Послідовність
		12345678901234567890123456789012
6	VH2-70/JH6 FR1	EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS
7	VH2-70/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
8	VH2-70/JH6 FR3	RLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATATYYCAR
9	VH2-70/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
10	VH2-26/JH6 FR1	EVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLS
7	VH2-26/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
11	VH2-26/JH6 FR3	RLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATATYYCAR
9	VH2-26/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
12	VH3-72/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
13	VH3-72/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVG
14	VH3-72/JH6 FR3	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLRKTEDTAVYYCAR
9	VH3-72/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
15	VH3-21/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
16	VH3-21/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
17	VH3-21/JH6 FR3	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAR
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

21	VH1-18/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
19	VH1-18/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
22	VH1-18/JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
9	VH1-18/JH6 FR4	WGQGTITVTVSS
35	IGHV4-59 FR1	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS
36	IGHV4-59 FR2	WIRQPPGKGLEWIG
37	IGHV4-59 FR3	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
38	IGHV4-59/JH FR4	WGQGTITVTVSS
39	IGHV3-66 FW1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSIS
40	IGHV3-66 FW2	WIRQAPGKGLEWIG
41	IGHV3-66 FW3	RVTISVDTSKNSFYLMNSLRAEDTAVYYCAR
42	IGHV3-66/JH FW4	WGQGTITVTVSS
43	IGHV4-59 FR1	EVQLQESGPGLVKPSGETLSLTCTVSGGSIS
44	IGHV4-59 FR2	WIRQAPGKGLEWIG
45	IGHV4-59 FR3	RVTISVDTSKNQFYLKLSSVRAEDTAVYYCAR
46	IGHV4-59/JH FR4	WGQGTITVTVSS
47	IGHV5-51 FR1	EVQLVQSGTEVKKPGESLKISCKVSGGSIS
48	IGHV5-51 FR2	WIRQMPGKGLEWIG
49	IGHV5-51 FR3	QVTISVDTSFNTFFLQWSSLKASDTAMYYCAR
50	IGHV5-51/JH FR4	WGQGTITVTVSS
51	IGHV2-70 FR1	EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTVSGGSIS
52	IGHV2-70 FR2	WIRQPPGKGLEWIG
53	IGHV2-70 FR3	RVTISVDTSKNQFVLTMTNMDPVDATYYCAR
54	IGHV2-70/JH FR4	WGQGTITVTVSS
55	IGHV3-15 FR1	EVQLLESGGGLVKSGGSLRLSCAASGFTFR
56	IGHV3-15 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
57	IGHV3-15 FR3	RFTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCAK
58	IGHV3-15/JH FR4	WGQGTITVTVSS
59	IGHV3-43 FR1	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG
60	IGHV3-43 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
61	IGHV3-43 FR3	RFTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCAK
62	IGHV3-43/JH FR4	WGQGTITVTVSS

Таблиця 3

Акцепторні послідовності легкого ланцюга

SEQ ID NO.:	Область білка/ близькоспоріднене сімейство зародкової лінії	Послідовність
		12345678901234567890123456789012
23	B3/JK4 FR1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
24	B3/JK4 FR2	WYQQKPGQPPKLLIY
25	B3/JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC
26	B3/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
27	L2/JK4 FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
28	L2/JK4 FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
29	L2/JK4 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
26	L2/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
30	L15/JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC

31	L15/JK4 FR2	WYQQKPEKAPKSLIY
32	L15/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYC
26	L15/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
33	L5/JK4 FR1	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC
34	L5/JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
32	L5/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYC
26	L5/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
63	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
64	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
65	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC
66	IGLV3-1/JL FR4	FGYGTKVTVL
67	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
68	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
69	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC
70	IGLV3-1/JL FR4	GGGTKLTVLG
71	IGLV3-1 FR1	YELTQPPSVSVSPGQTASITC
72	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
73	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC
74	IGLV3-1/JL FR4	GGGTKLTVLG
75	IGLV3-1 FR1	LYVLTQPPSVSVSPGQTASITC
76	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
77	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQTMDEADYLC
78	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKVTVLG
79	IGKV6D-21 FR1	EYVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC
80	IGKV6D-21 FR2	WYQQKPDQSPKLVIIY
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	DIPARFSGSNSGDEATLTISSLQSEDFAVYYC
86	IGKV3D-15/JK FR4	FGQGTRLEIKR
87	IGKV4-1 FR1	DYVLTQSPDSLAVSLGERATINC
88	IGKV4-1 FR2	WYQQKPGQSPKLVIIY
89	IGKV4-1 FR3	GIPDRFSGSNSGDDATLTISSLQAEDVAVYYC
90	IGKV4-1/JK FR4	FGGGTKVEIKR
91	IGLV3-1 FR1	LPVLTQPPSVSVSPGQTASITC
92	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
93	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQTMDEADYLC
94	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKVTVL
95	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
96	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
97	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQTMDEADYLC
98	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKLTVL

Використовувані тут терміни "ген антитіла зародкової лінії" або "генний фрагмент" означають послідовність імуноглобуліну, кодовану нелімфоїдними клітинами, які не піддавалися процесу дозрівання, що приводить до генетичного реаранжування і мутації, для експресії конкретного імуноглобуліну (див., наприклад, Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv. Exp. Med. Biol. 484: 13-30 (2001)). Одна з переваг різних варіантів даного винаходу полягає в тому, що гени антитіла зародкової лінії з більшою імовірністю, ніж гени зрілого антитіла, будуть зберігати основні структури амінокислотної послідовності, характерні для індивідумів даного виду, а отже, менш ймовірно, що вони будуть розпізнаватися як послідовності, що походять з чужорідного джерела, при їх терапевтичному застосуванні в даних видах.

Використовуваний тут термін "ключовий залишок" означає певні залишки варіабельної області, які впливають значний чином на специфічність зв'язування антитіла і/або афінність антитіла, зокрема гуманізованого антитіла. Ключовими залишками є, але не обмежуються ними, один або декілька з нижченаведених залишків: залишок, який є суміжним з CDR; потенційний сайт глікозилювання (N- або O-глікозилювання); рідкий залишок; залишок, що має здатність взаємодіяти з антигеном; залишок, що має здатність взаємодіяти з CDR; канонічний залишок; залишок в зоні контактування варіабельної

області важкого ланцюга з варіабельною областю легкого ланцюга; залишок в зоні Верньєра; і залишок в області, яка перекривається з CDR1 варіабельного важкого ланцюга, як визначено по Чотіа, і з першою каркасною областю важкого ланцюга, як визначено по Кебату.

Використовуваний тут термін "зона Верньєра" означає субнабір з каркасних залишків, які можуть здійснювати коректування структури CDR і тонке коректування для адаптації цих залишків до даного антигену, як описано Foote і Winter (J. Mol. Biol., 224: 487-499 (1992)). Залишки зони Верньєра утворюють шар, що лежить в основі CDR, і можуть впливати на структуру CDR і афінність даного антитіла.

Використовуваний тут термін "нейтралізація" стосується запобігання біологічній активності антигену при його специфічному зв'язуванні з антитілом. У одному з варіантів винаходу нейтралізуючий зв'язувальний білок зв'язується з антигеном і знижує його біологічну активність щонайменше приблизно на 20, 40, 60, 80, 85% або більше.

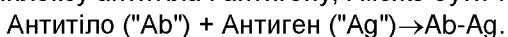
Термін "активність" включає таку активність, як специфічність/афінність зв'язування антитіла з антигеном, наприклад анти-hDLL4 антитіла, яке зв'язується з антигеном DLL4, і/або нейтралізуючу активність антитіла або анти-hDLL4 антитіла, яке зв'язується з hDLL4 і тим самим інгібує біологічну активність hDLL4, наприклад інгібує зв'язування рецептора в аналізі на зв'язування "ліганд-рецептор", або інгібує активацію рецептора в аналізі, що проводиться з використанням репортера людського рецептора Notch, або стимулює проліферацію в аналізі на розростання ендотеліальних клітин.

Термін "епітоп" включає будь-яку поліпептидну детермінанту, здатну специфічно зв'язуватися з імуноглобуліном або Т-клітинним рецептором. У деяких варіантах винаходу антигенні детермінанти або епітопи включають хімічно активні поверхневі групи молекул, таких як амінокислоти, цукрові бічні ланцюги, фосфорил або сульфоніл, а в деяких варіантах винаходу вони можуть мати специфічні тривимірні структурні властивості і/або можуть мати конкретний заряд. Епітоп являє собою область антигену, що зв'язується з антитілом. Так, наприклад, епітоп складається з амінокислотних залишків області антигену (або його фрагмента), який, як відомо, зв'язується з комплементарним сайтом на специфічному партнері по зв'язуванню. Антиген або його фрагмент можуть містити більше ніж один епітоп. Так, наприклад, для фахівця в даній галузі очевидно, що кожний "антигензв'язувальний сайт" молекули антитіла зв'язується з епітопом молекули антигену, а кожна молекула антигену може мати один, два, декілька або множину епітопів. Крім того, для фахівців в даній галузі очевидно, що два незалежно виділених антитіла проти молекули антигену можуть зв'язуватися з одним і тим же епітопом або з двома різними епітопами на молекулі антигену.

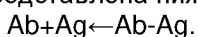
У деяких варіантах винаходу вважається, що антитіло специфічно зв'язується з антигеном, якщо воно розпізнає антиген-мішень в складній суміші білків і/або макромолекул. Кажуть, що антитіла "зв'язуються з одним і тим же епітопом", якщо вони перехресно конкурують з іншими антитілами (тобто одне з них запобігає зв'язувальній або модулюючій дії іншого). Крім того, структурні визначення епітопів (які перекриваються, аналогічні, ідентичні) є інформативними, а функціональні визначення часто є більш релевантними, оскільки вони включають структурні параметри (зв'язування) і функціональні параметри (модуляцію, конкурування).

Використовуваний тут термін "поверхневий плазмонний резонанс" означає оптичне явище, яке дозволяє проаналізувати біоспецифічні взаємодії в реальному часі за допомогою детектування змін концентрацій білка в біосенсорній матриці, наприклад, з використанням системи BIAcore® (BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden і Piscataway, NJ). Більш докладний опис можна знайти в публікаціях Jonsson U. et al., Ann. Biol. Clin. 51: 19-26 (1993); Jonsson U. et al., BioTechniques 11: 620-627 (1991); Johnsson B. et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8: 125-131; і Johnsson B. et al., Anal., Biochem. 198: 268-277 (1991).

Використовуваний тут термін " K_{on} " означає константу асоціації зв'язувального білка (наприклад, антитіла) з антигеном з утворенням, наприклад, комплексу "антитіло/антиген", відомого фахівцям. " K_{on} " також називається "константою швидкості асоціації" або " k_a ", і ці терміни є синонімами. Дана величина означає швидкість зв'язування антитіла з його антигеном-мішенню або швидкість утворення комплексу антитіла і антигену, і може бути також представлена нижченаведеним рівнянням:



Використовуваний тут термін " K_{off} " означає константу дисоціації або "константу швидкості дисоціації" зв'язувального білка (наприклад, антитіла), наприклад, з комплексу "антитіло/антиген", відомого фахівцям. Дана величина означає швидкість дисоціації антитіла з його антигену-мішені або розділення комплексу Ab-Ag протягом певного періоду часу з утворенням вільного антитіла і антигену, і представлена нижченаведеним рівнянням:



Використовувані тут терміни "константа рівноважної дисоціації" або " K_D " є синонімами і означають величину, одержану шляхом вимірювання титрів при рівновазі або шляхом ділення константи швидкості дисоціації (K_{off}) на константу швидкості асоціації (K_{on}). Константа швидкості асоціації, константа швидкості дисоціації і константа рівноважної дисоціації використовуються для визначення

афінності зв'язування антитіла з антигеном. Методи визначення констант швидкості асоціації і дисоціації добре відомі фахівцям. Застосування флуоресцентних методів дозволяє з високою мірою чутливості проаналізувати зразки в фізіологічних буферах при рівновазі. Можуть бути застосовані і інші експериментальні підходи, такі як аналіз BIAcore® (аналіз на біомолекулярну взаємодію) і експериментальне обладнання (наприклад, обладнання, що постачається компанією BIAcore International AB, а GE Healthcare company, Uppsala, Sweden). Крім того, може бути також використаний аналіз KinExA® (кінетичний ексклюзійний аналіз), розроблений компанією Savidyne Instruments (Boise, Idaho).

Терміни "мітка" і "детектована мітка" означають молекулу, яка приєднується до партнера, що специфічно зв'язується, такого як антитіло або аналіт, наприклад, для забезпечення реакції між членами пари специфічного зв'язування, такими як антитіло і аналіт, де вказана мітка є детектованою, а вказаний партнер по специфічному зв'язуванню, наприклад мічені таким чином антитіло або аналіт, також є "детектовано міченим". Таким чином, використовуваний тут термін "мічений зв'язувальний білок" означає білок з міткою, включеною в нього з метою ідентифікації вказаного зв'язувального білка. У одному з варіантів винаходу, міткою є детектований маркер, який може продукувати сигнал, детектований візуально або за допомогою приладів, наприклад за допомогою включення радіоактивно міченої амінокислоти або приєднання до поліпептиду біотинільних груп, які можуть бути детектовані поміченим авідіном (наприклад, стрептавідином, який містить флуоресцентний маркер або має ферментативну активність, яка може бути детектована оптичними або колориметричними методами). Прикладами міток для поліпептидів є, але не обмежуються ними, радіоізотоп або радіонукліди (наприклад, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho і ^{153}Sm); хромогени, флуоресцентні мітки (наприклад, ФІТЦ, родамін, флуоресціючі речовини лантанідної групи), ферментативні мітки (наприклад, пероксидаза хрому, люцифераза, лужна фосфатаза); хемілюмінесцентні маркери; біотинільні групи; попередньо визначені поліпептидні епітопи, розпізнавані вторинним репортером (наприклад, послідовностями пари "лейцинова блискавка", сайтами зв'язування з "другими" антитілами, металзв'язувальними доменами, епітопними мітками); і магнітні агенти, такі як хелатні комплекси гадолінію. Репрезентативними прикладами міток, найбільш часто використовуваних в імуноаналізах, є молекули, які випромінюють світло, наприклад сполуки акридинію, і молекули, що мають флуоресцентну дію, наприклад флуоресцеїн. У даній заявці описані і інші мітки. У зв'язку з цим потрібно зазначити, що сама така молекула не може бути детектовано міченою, але може стати детектованою після її реакції з іншою молекулою. Використання "детектовано міченої" молекули включає детектоване мічення останнього типу.

Термін "кон'югат антитіла" означає зв'язувальний білок, такий як антитіло, хімічно зв'язане з другою хімічною молекулою, такою як терапевтичний або цитотоксичний засіб. Використовуваний тут термін "агент" означає хімічну сполуку, суміш хімічних сполук, біологічну макромолекулу або екстракт, одержаний з біологічних матеріалів. Переважно, терапевтичними або цитотоксичними засобами є, але не обмежуються ними, коклюшний токсин, таксол, цитохалазин В, граміцидин D, етидйбромід, еметин, мітоміцин, етопозид, тенопозид, вінкрисдин, вінбластин, колхіцин, доксорубіцин, даунорубіцин, дигідроксіантрацидин, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, тетракаїн, лідокаїн, пропранолол і пуроміцин і його аналоги або гомологи.

Використовувані тут терміни "кристал" і "кристалізований" стосуються білка, що зв'язується (наприклад, антитіла), або його антигензв'язувальної частини, які присутні у формі кристала. Кристали являють собою одну з форм твердого стану речовини, яка відрізняється від інших форм, таких як аморфний твердий стан або рідкий кристалічний стан. Кристали складаються з регулярних, повторюваних тривимірних кристалічних решіток атомів, іонів, молекул (наприклад, білків, таких як антитіла) або молекулярних агрегатів (включаючи комплекси Fab/антиген). Ці тривимірні кристалічні решітки є впорядкованими відповідно до їх математичних співвідношень, які добре відомі фахівцям в даній галузі. Фундаментальна одиниця або структурний блок, повторюваний в кристалах, називається асиметричною коміркою. Повторення асиметричної комірки в даній структурі, яка відповідає добре визначеній кристалографічній симетрії, дозволяє називати її "елементарною коміркою" кристала. Повторення цієї елементарної комірки за допомогою регулярної трансляції у всіх трьох вимірюваннях утворює кристал. Див. Giege et al., Crystallization of Nucleic Acids і Proteins, a Practical Approach, 2nd ed. (Ducruix and Giege, eds.) (Oxford University Press, New York, 1999), розділ 1, стор. 1-16.

Термін "полінуклеотид" означає полімерну форму, що складається з двох або більше нуклеотидів, а саме рибонуклеотидів або дезоксирибонуклеотидів, або модифіковану форму, що складається з нуклеотидів будь-якого типу. Цей термін включає одноланцюжкову і дволанцюжкову форми ДНК.

Термін "ізолюваний полінуклеотид" означає полінуклеотид (наприклад, геномну ДНК, кДНК, синтетичну ДНК або їх комбінацію), який, за своїм походженням, не зв'язаний з повнорозмірним полінуклеотидом або з його частиною, разом з якими даний "ізолюваний полінуклеотид" виявляється в природі; або полінуклеотид, який функціонально приєднаний до полінуклеотиду, з яким він не зв'язаний в природі; або полінуклеотид, який не існує в природі як частина більш великої послідовності.

Термін "вектор" означає молекулу нуклеїнової кислоти, здатну здійснювати транспорт іншої нуклеїнової кислоти, з якою він був зв'язаний. Одним з типів вектора є "плазмід", що являє собою кільцеву дволанцюжкову ДНК-петлю, в яку можуть бути ліговані додаткові ДНК-сегменти. Іншим типом вектора є вірусний вектор, у вірусний геном якого можуть бути ліговані додаткові ДНК-сегменти. Деякі вектори мають здатність автономно реплікуватися в клітині-хазяїні, в яку вони були вбудовані (наприклад, бактеріальні вектори, що мають бактеріальний ориджин реплікації і епісомні вектори ссавців). Інші вектори (наприклад, неепісомні вектори ссавців) можуть бути інтегровані в геном клітини-хазяїна після їх введення в цю клітину-хазяїна, а потім реплікуватися разом з геномом хазяїна. Крім того, деякі вектори здатні направляти експресію генів, до яких вони функціонально приєднані. Такі вектори називаються тут "рекомбінантними експресійними векторами" (або просто "експресійними векторами"). У загальних рисах, експресійні вектори, застосовувані в методах рекомбінантних ДНК, часто присутні у формі плазмід. У даному описі терміни "плазмід" і "вектор" можуть бути синонімами, оскільки плазмід найчастіше використовується як вектор. Однак даний винахід включає і інші форми експресійних векторів, таких як вірусні вектори (наприклад, дефектні по реплікації ретровіруси, аденовіруси і аденоасоційовані віруси), які мають еквівалентні функції. У даному винаході можуть бути також використані РНК-варіанти векторів (включаючи вірусні РНК-вектори).

Термін "функціонально приєднаний" стосується положень в області стику (юкта-положень), де описані компоненти знаходяться в такому взаємозв'язку, який відповідним чином забезпечує їх функціонування. Регуляторна послідовність, "функціонально приєднана" до кодуючої послідовності, лігована так, щоб експресія кодуючої послідовності досягалася в умовах, сумісних з умовами дії регуляторних послідовностей. "Функціонально приєднаними" послідовностями є послідовності регуляції експресії, які є суміжними з геном, що представляє інтерес, і послідовності регуляції експресії, які здійснюють регуляцію гена, що представляє інтерес, *in trans*, тобто розташовані не на молекулі гена, що представляє інтерес, а на молекулі іншої нуклеїнової кислоти, а також послідовності регуляції експресії, які розташовані на тій же самій молекулі нуклеїнової кислоти, але на деякій відстані від гена, що представляє інтерес. Використовуваний тут термін "послідовність регуляції експресії" означає полінуклеотидні послідовності, які необхідні для експресії і процесингу кодуючих послідовностей, з якими вони ліговані. Послідовностями регуляції експресії є відповідні послідовності ініціації транскрипції, послідовності термінації транскрипції, промотори і енхансерні послідовності; сигнали для ефективного РНК-процесингу, такі як сигнали сплайсингу і поліаденілювання; послідовності, що стабілізують цитоплазматичну мРНК; послідовності, що підвищують ефективність трансляції (тобто консенсусна послідовність Козака); послідовності, що підвищують стабільність білка, і, якщо це необхідно, послідовності, що підвищують рівень секреції білка. Природа таких регуляторних послідовностей варіюється залежно від типу організму-хазяїна, наприклад, в прокаріотах такими регуляторними послідовностями звичайно є промотор, сайт зв'язування з рибосомою і послідовність термінації транскрипції, а в еукаріотах такими регуляторними послідовностями звичайно є промотори і послідовність термінації транскрипції. Термін "регуляторні послідовності" включає компоненти, присутність яких грає важливу роль в експресії і процесингу, і ці послідовності можуть також включати додаткові компоненти, присутність яких є переважною, наприклад лідерні послідовності і послідовності партнерів по злиттю.

Термін "трансформація" означає будь-який спосіб, за допомогою якого екзогенна нуклеїнова кислота (наприклад, молекула ДНК) може бути введена в клітину-хазяїна. Трансформація може бути здійснена в природних умовах або в умовах, штучно створених різними методами, добре відомими фахівцям. Трансформація може бути здійснена будь-яким методом, придатним для вбудовування чужорідних послідовностей нуклеїнової кислоти в прокаріотичні або еукаріотичні клітини-хазяїни. Цей метод вибирають, виходячи з трансформованої клітини-хазяїна, і таким методом може бути, але не обмежується ними, одержання плазміди, проникаючої через клітинну мембрану, інфікування вірусом, електропорація, ліпофекція і бомбардування частинками. Вказаними "трансформованими" клітинами є стабільно трансформовані клітини, в яких вбудована ДНК має здатність реплікуватися або як автономно реплікована плазмід, або як частина хромосоми хазяїна. Такими клітинами також є клітини, які тимчасово експресують вбудовану ДНК або РНК протягом обмеженого періоду часу.

Термін "рекомбінантна клітина-хазяїн" (або просто "клітина-хазяїн") означає клітину, в яку була вбудована екзогенна ДНК. У одному з варіантів винаходу клітина-хазяїн включає дві або більше (наприклад, множину) нуклеїнових кислот, що кодують антитіла, наприклад клітини-хазяїни, описані, наприклад, в патенті США № 7262028. Ці терміни стосуються не тільки клітини, що конкретно розглядається, але також і потомства такої клітини. Оскільки в подальших генераціях можуть бути присутніми деякі модифікації, зумовлені або мутацією, або впливом навколишнього середовища, то таке потомство, фактично, не може бути ідентичним батьківській клітині, але воно також входить в обсяг використовуваного тут терміна "клітина-хазяїн". У одному з варіантів винаходу клітинами-хазяїнами є прокаріотичні і еукаріотичні клітини, вибрані з царства живих організмів. У іншому варіанті винаходу еукаріотичними клітинами є клітини найпростіших, грибів, рослин і тварин. У іншому варіанті винаходу клітинами-хазяїнами є, але не обмежуються ними, прокаріотична клітинна лінія *E.coli*;

клітинні лінії ссавців CHO, HEK 293, COS, NS0, SP2 і PER.C6; клітинна лінія комах Sf9 і клітинна лінія грибів, таких як *Saccharomyces cerevisiae*.

Для одержання рекомбінантних ДНК, а також для олігонуклеотидного синтезу, культивування і трансформації тканин можуть бути застосовані стандартні методи (наприклад, електропорація, ліпофекція). Методи із застосуванням ферментативних реакцій і методи очищення можуть бути здійснені відповідно до інструкцій виробників або згідно зі стандартними процедурами, відомими фахівцям, або відповідно до опису в даній заявці. Вищезазначені методи і процедури можуть бути здійснені стандартними методами, добре відомими фахівцям, і описаними в різних загальних і спеціальних керівництвах, цитованих і обговорюваних в даній заявці. Див., наприклад, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989).

Термін "трансгенний організм", відомий фахівцям, означає організм, що має клітини, які містять трансген, де вказаний трансген, введений в організм (або "предок" такого організму), експресує поліпептид, який в природі не експресується в даному організмі. "Трансген" являє собою ДНК-конструкцію, яка стабільно і функціонально інтегрується в геном клітини, від якої походить такий трансгенний організм, і направляє експресію кодованого генного продукту в клітини або тканини трансгенного організму одного або декількох типів.

Використовувані тут терміни "регуляція" і "модуляція" є синонімами і означають зміни або модифікації активності молекули, що представляє інтерес (наприклад, біологічної активності hDLL4). Модуляція може приводити до збільшення або зниження величини певної активності або функції молекули, що представляє інтерес. Репрезентативними активністю або функціями молекули є, але не обмежуються ними, зв'язувальні властивості, ферментативна активність, активація клітинного рецептора і передача сигналу.

Відповідно до цього, термін "модулятор" означає сполуку, здатну змінювати або модифікувати активність або функцію молекули, що представляє інтерес (наприклад, біологічну активність hDLL4). Так, наприклад, модулятор може сприяти збільшенню або зниженню величини певної активності або функції молекули, що представляє інтерес, в порівнянні з величиною активності або функції, спостережуваною за відсутності даного модулятора. У деяких варіантах винаходу модулятором є інгібітор, який сприяє зниженню величини щонайменше однієї активності або функції молекули. Репрезентативними інгібіторами є, але не обмежуються ними, білки, пептиди, антитіла, пептидні антитіла, вуглеводи і невеликі органічні молекули. Пептидні антитіла описані, наприклад, в публікації PCT № WO01/83525.

Термін "агоніст" означає модулятор, який, при його контактуванні з молекулою, що представляє інтерес, викликає збільшення величини певної активності або функції даної молекули, в порівнянні з величиною активності або функції, спостережуваною за відсутності даного агоніста. Конкретними агоністами, що представляють інтерес, є, але не обмежуються ними, члени шляху передачі сигналу Notch, поліпептиди і нуклеїнові кислоти DLL4, вуглеводи або будь-які інші молекули, які зв'язуються з DLL4.

Використовувані тут терміни "антагоніст" або "інгібітор" означають модулятор, який, при його контактуванні з молекулою, що представляє інтерес, викликає зниження величини певної активності або функції даної молекули, в порівнянні з величиною активності або функції, спостережуваною за відсутності даного антагоніста. Конкретними антагоністами, що представляють інтерес, є антагоністи, які блокують або модулюють біологічну або імунологічну активність DLL4, зокрема людського DLL4 (hDLL4). Антагоністами і інгібіторами hDLL4 можуть бути, але не обмежуються ними, білки, нуклеїнові кислоти, вуглеводи або будь-які інші молекули, які зв'язуються з hDLL4 і/або з DLL4 гризунів.

Використовуваний тут термін "ефективна кількість" означає кількість терапевтичного засобу, яка є достатньою для ослаблення тяжкості розладу або одного або декількох його симптомів і/або для зниження їх тривалості, і для попередження прогресування розладу, а також для досягнення ремісії даного розладу, для запобігання або попередження виникнення рецидивів, розвитку, початку або прогресування одного або декількох симптомів, асоційованих з даним розладом, для виявлення даного розладу або для посилення або поліпшення профілактичного(их) або терапевтичного(их) ефекту(ів) іншого терапевтичного засобу (наприклад, профілактичного або терапевтичного засобу).

Терміни "пацієнт" і "індивідуум" можуть бути використані тут як синоніми і означають тварину, таку як ссавець, включаючи приматів (наприклад, людину, мавп і шимпанзе), ссавців, що не є приматами (наприклад, корів, свиней, верблюдів, лам, коней, кіз, кроликів, овець, хом'яків, морських свинок, кішок, собак, щурів, мишей і китів), птахів (наприклад, качок або гусей) і акул. При цьому переважним пацієнтом або індивідуумом є людина, наприклад людина, яка проходить лікування або обстеження з приводу якого-небудь захворювання, розладу або стану; людина з ризиком розвитку у нього даного захворювання, розладу або стану; людина, страждаюча даним захворюванням, розладом або станом; і/або людина, що піддається лікуванню даного захворювання, розладу або стану. При цьому більш переважно, якщо даний пацієнт або індивідуум піддається лікуванню з приводу раку або іншого захворювання або обстеженню на наявність раку або іншого захворювання, при якому наявне

порушення експресії DLL4 підтверджує наявність раку або іншого захворювання, а інгібування або пригнічення активності DLL4 є бажаним для лікування раку або іншого захворювання.

Використовуваний тут термін "зразок" застосовується в найбільш широкому розумінні. Використовуваний тут термін "біологічний зразок" включає, але не обмежується ними, будь-яку кількість речовини, взяту у живої істоти або у раніше живої істоти. Такими живими істотами є, але не обмежуються ними, людина, миші, щури, мавпи, собаки, кролики і інші тварини. Вказаними речовинами є, але не обмежуються ними, кров (наприклад, цільна кров), плазма, сироватка, сеча, амніотична рідина, синовіальна рідина, ендотеліальні клітини, лейкоцити, моноцити, інші клітини, органи, тканини, кістковий мозок, лімфоузли і селезінка.

Терміни "компонент", "компоненти" і "щонайменше один компонент" означають іммобілізоване антитіло, детектуюче або кон'юговане антитіло, контроль, калібрувальний маркер, серію калібрувальних маркерів, набір тест-сполук для визначення чутливості, контейнер, буфер, розріджувач, сіль, фермент, кофактор для ферменту, детектуючий реагент, реагент/розчин для попередньої обробки, субстрат (наприклад, у вигляді розчину), блокувальний розчин і т. п., які можуть бути включені в набір для аналізу тест-зразка, такого як проба сечі, сироватки або плазми пацієнта, який проводиться відповідно до описаних тут методів і інших методів, відомих фахівцям. Таким чином, в контексті даного винаходу терміни "щонайменше один компонент", "компонент" і "компоненти" можуть включати поліпептид або інші аналіти, описані вище, такі як композиція, що містить аналіт, такий як поліпептид, необов'язково іммобілізований на твердому носії, наприклад, за допомогою зв'язування з антитілом проти аналіту (наприклад, проти поліпептиду). Деякі компоненти можуть бути присутніми в розчині або в ліофілізованій формі, яку потім розводять для використання в аналізі.

Термін "ризик" означає можливість або імовірність здійснення конкретної події або на даний час, або в який-небудь момент в майбутньому. "Стратифікація ризику" означає набір відомих клінічних факторів ризику, який дозволяє лікарю класифікувати пацієнтів як пацієнтів з низьким, помірним, високим або дуже високим ризиком розвитку конкретного захворювання, розладу або стану.

Терміни "специфічний" і "специфічність", застосовувані в зв'язку з взаємодією між членами пари, що специфічно зв'язується, наприклад антигену або його фрагмента і антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, стосуються селективної реактивності даної взаємодії. Термін "специфічно зв'язується з ..." і аналогічні терміни стосуються здатності антитіл (або їх антигензв'язувальних фрагментів) специфічно зв'язуватися з аналітом (або з його фрагментом), але не з іншими молекулами.

"Партнер по специфічному зв'язуванню" являє собою член пари, що специфічно зв'язується. Пара, що специфічно зв'язується, містить дві різних молекули, кожна з яких специфічно зв'язується одна з одною по хімічному або фізичному механізму. Тому крім пари, що специфічно зв'язується, такої як антиген-антитіло, можуть бути використані і інші пари, що специфічно зв'язуються, які можуть включати біотин і авідин (або стрептавідин), вуглеводи і лектини, комплементарні нуклеотидні послідовності, молекули ефекторів і рецепторів, кофактори і ферменти, інгібітори ферментів і ферменти і т. п. Крім того, пари, що специфічно зв'язуються, можуть включати члени, які є аналогами вихідних членів, що специфічно зв'язуються, таких як, наприклад, аналіт-аналог. Імунореактивними членами, що специфічно зв'язуються, є антигени, фрагмент антигену і антитіла, включаючи моноклональні і поліклональні антитіла, а також комплекси, фрагменти і варіанти (включаючи фрагменти варіантів), незалежно від того, чи є вони виділеними або рекомбінантно продукованими.

Використовуваний тут термін "варіант" означає поліпептид, який, по своїй амінокислотній послідовності, відрізняється від даного поліпептиду (наприклад, поліпептиду DLL4 або анти-DLL4 антитіла), що зумовлено додаванням (наприклад, інсерцією), делецією або консервативною заміною амінокислот, але при цьому зберігає біологічну активність даного поліпептиду (наприклад, варіант DLL4 може конкурувати з DLL4 дикого типу за зв'язування з анти-DLL4 антитілом, якщо варіант DLL4 зберігає вихідний антигензв'язувальний сайт (епітоп) DLL4 дикого типу). Консервативна амінокислотна заміна, тобто заміна однієї амінокислоти на іншу амінокислоту з аналогічними властивостями (наприклад, гідрофільністю і мірою розподілу заряджених областей), може бути легко здійснена фахівцем, оскільки звичайно така заміна є дуже несуттєвою. Такі незначні заміни можуть бути, частково, ідентифіковані шляхом визначення гідропатичного індексу амінокислот, відомого фахівцям (див., наприклад, Kyte et al., J. Mol. Biol. 157: 105-132 (1982)). Гідропатичний індекс амінокислот визначають, виходячи з їх гідрофобності і заряду. Фахівцям в даній галузі відомо, що при заміні амінокислот на амінокислоти з аналогічними гідропатичними індексами функції білка можуть бути збережені. У одному з аспектів винаходу, амінокислоти, що мають гідропатичні індекси ± 2 , є заміненіми. Гідрофільність амінокислот може бути також використана для виявлення заміни, які мають приводити до одержання білків, що зберігають свою біологічну функцію. Визначення гідрофільності амінокислот в даному пептиді дозволяє обчислити найбільшу локальну середню гідрофільність цього пептиду, яка, як повідомлялося, є цінним параметром, добре корелюючим з антигенністю і імуногенністю (див., наприклад, патент США № 4554101). Заміна амінокислот, які мають аналогічні значення гідрофільності, може приводити до одержання пептидів, які зберігають біологічну активність,

наприклад імуногенність, як відомо фахівцям. У одному з аспектів винаходу кожна амінокислоту замінюють амінокислотою, що має величину гідрофільності в межах ± 2 . На індекс гідрофобності і на величину гідрофільності амінокислот впливає конкретний бічний ланцюг цієї амінокислоти. Згідно з цим спостереженням, вибір амінокислотних замін, сумісних з біологічною функцією, залежить від відносної схожості амінокислот, зокрема від схожості бічних ланцюгів цих амінокислот, що може бути виявлено по гідрофобності, гідрофільності, заряду, розміру і інших властивостях амінокислот. Термін "варіант" може бути також використаний для опису поліпептиду або його фрагмента, який був підданий альтернативному процесингу, такому як протеоліз, фосфорилування або інша посттрансляційна модифікація, і який зберігає свою біологічну активність або реактивність відносно антигену, наприклад здатність зв'язуватися з DLL4. Використовуваний тут термін "варіант" включає фрагменти варіанта, якщо це не суперечить контексту опису винаходу.

Використовуваний тут термін "зразок" застосовується в найбільш широкому розумінні. Використовуваний тут термін "біологічний зразок" включає, але не обмежується ними, будь-яку кількість речовини, взятую у живої істоти або у раніше живої істоти. Такими живими істотами є, але не обмежуються ними, людина, миші, щури, мавпи, собаки, кролики і інші тварини. Вказаними речовинами є, але не обмежуються ними, кров, сироватка, сеча, синовіальна рідина, клітини, органи, тканини, кістковий мозок, лімфоузли і селезінка.

I. Антитіла, які зв'язуються з людським DLL4

У одному з аспектів даний винахід стосується ізольованих людських моноклональних антитіл або їх антигензв'язувальних частин, які зв'язуються з DLL4 з високою афінністю, низькою швидкістю дисоціації і/або з високою нейтралізуючою активністю. Такі людські антитіла або їх антигензв'язувальні частини, які зв'язуються з DLL4, переважно можуть бути використані в медицині як терапевтичні засоби, які можуть бути введені людині і дають мінімальну імунну відповідь або взагалі не продукують імунної відповіді у людини на терапевтичний DLL4-зв'язувальний білок, що вводиться. Відповідно до цього, у пацієнта може спостерігатися сприятливий ефект від введення таких повністю людських DLL4-зв'язувальних білків в процесі всього курсу повторних введень. У інших аспектах даний винахід стосується химерних антитіл, які зв'язуються з DLL4, і CDR-прищеплених антитіл або їх антигензв'язувальних частин, які зв'язуються з DLL4. Переважними антитілами або їх частинами є ізольовані антитіла. Переважними антитілами згідно з винаходом є нейтралізуючі людські анти-DLL4 антитіла.

A. Спосіб одержання анти-DLL4 антитіл

Антитіла згідно з винаходом можуть бути одержані будь-яким з ряду відомих методів. Переважним методом є технологія представлення мРНК PROfusion, описана в прикладі 2 цієї заявки. Іншим методом є імунізація трансгенних гризунів (наприклад, трансгенних мишей), які несуть функціональний комплемент людського гена імуноглобуліну, людським DLL4 або його антигензв'язувальною частиною, з подальшим проведенням стандартної гібридомної технології для одержання гібридом, експресуючих повністю людські моноклональні антитіла, які зв'язуються з людським DLL4. Рекомбінантні людські антитіла, одержані таким методом, мають варіабельні і константні області, що походять від послідовностей імуноглобуліну людської зародкової лінії. Такі методи дозволяють одержати повністю людські DLL4-зв'язувальні білки і не вимагають якого-небудь додаткового проведення одного або декількох раундів гуманізації з метою зниження рівня антигенності, джерелом якої є нелюдські молекули моноклонального анти-DLL4 антитіла. Відповідно до цього, методи, що проводяться з використанням матеріалу, що походить від множини видів, є менш переважними, але, проте, вони можуть бути застосовані.

Потрібно також зазначити, що використовуваний тут термін "моноклональне антитіло" не обмежується антитілами, одержаними із застосуванням гібридомної технології. Термін "моноклональне антитіло" означає антитіло, що походить від одного клону, включаючи будь-які еукаріотичні, прокаріотичні або фагові клони, незалежно від методу, яким воно було одержане.

Додаткові аспекти різних методів, які можуть бути застосовані для одержання молекул моноклональних анти-DLL4 антитіл згідно з винаходом, описані нижче.

1. Одержання анти-DLL4 моноклональних антитіл за допомогою гібридомної технології

Моноклональні антитіла можуть бути одержані із застосуванням методів широкого ряду, відомих фахівцям, включаючи застосування гібридомних технологій, рекомбінантних методів і методів фагового представлення або їх комбінацій. Так, наприклад, моноклональні антитіла можуть бути продуковані гібридомними методами, включаючи методи, відомі фахівцям і описані, наприклад, в публікації 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) (вказані публікації у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання). Методи продукування і скринінгу специфічних антитіл із застосуванням гібридомної технології є рутинними і добре відомі фахівцям. У одному з варіантів даний винахід стосується способів одержання моноклональних антитіл, а також антитіл, одержаних способом, який включає культивування гібридомних клітин, секретуючих антитіло згідно з винаходом, де переважно

вказану гібридому одержують шляхом злиття спленоцитів, виділених у мишей, імунізованих антигеном згідно з винаходом, з мієломними клітинами, а потім скринінгу гібридом, одержаних за допомогою такого злиття, на гібридомні клони, секретуючі антитіло, здатне зв'язуватися з поліпептидом згідно з винаходом. Коротко, миша може бути імунізована антигеном DLL4. У переважному варіанті винаходу антиген DLL4 вводять разом з ад'ювантом для стимуляції імунної відповіді. Такими ад'ювантами є повний або неповний ад'ювант Фрейнда, RIBI (мураміддипептиди) або ISCOM (імуностимулюючі комплекси). Такі ад'юванти можуть захищати поліпептид від швидкого диспергування шляхом його поміщення в місцевий депозитарій, або вони можуть містити речовини, стимулюючі секрецію факторів хазяїна, які індують хемотаксис макрофагів і інших компонентів імунної системи. Якщо вводиться поліпептид, то схема імунізації буде переважно включати два або більше введення поліпептиду протягом декількох тижнів, однак, даний поліпептид може бути також введений і один раз.

Після імунізації тварини антигеном DLL4, у цієї тварини можуть бути продуковані антитіла і/або від цієї тварини можуть бути одержані антитілопродукуючі клітини. Сироватку, що містить анти-DLL4 антитіло, одержують шляхом забору крові у тварини або її умертвіння. Сироватка може бути використана в тому вигляді, в якому вона була одержана від тварини, і з цієї сироватки може бути виділена імуноглобулінова фракція, або з цієї сироватки можуть бути виділені анти-DLL4 антитіла. Одержані таким чином сироватка або імуноглобуліни є поліклональними і мають неоднорідний набір властивостей.

Після детектування імунної відповіді, антитіла, специфічні до антигену DLL4, наприклад, детектують в мишачій сироватці, а потім у мишей витягують селезінку і виділяють спленоцити. Потім спленоцити піддають злиттю добре відомими методами з будь-якими придатними мієломними клітинами, наприклад з клітинами, що походять від клітинної лінії SP20, наявної в Американській колекції типових культур (ATCC, Manassas, Virginia, US). Гібридами відбирають і клонують шляхом лімітуючого розведення. Після цього гібридомні клони аналізують методами, відомими фахівцям, на клітини, секретуючі антитіла, здатні зв'язуватися з DLL4. Асцитна рідина, яка звичайно містить високі рівні антитіл, може бути одержана шляхом імунізації мишей позитивними гібридомними клонами.

У іншому варіанті винаходу антитілопродукуючі іморталізовані гібридами можуть бути одержані від імунізованої тварини. Після імунізації тварин умертвляють, і В-клітини селезінки піддають злиттю з іморталізованими мієломними клітинами методом, добре відомим фахівцям. Див., наприклад, Harlow and Lane, див. вище. У переважному варіанті винаходу мієломні клітини не секретують імуноглобулінові поліпептиди (несекреторна клітинна лінія). Після злиття і відбору на резистентність до антибіотиків, гібридами скринують з використанням DLL4 або його частини, або клітин, експресуючих DLL4. У переважному варіанті винаходу попередній скрининг здійснюють за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) або радіоімуноаналізу (RIA), і переважно ELISA. Приклад ELISA-скринінгу наводиться в публікації заявки PCT № WO 00/37504, яка вводиться в даний опис за допомогою посилання.

Гібридами, продукуючі анти-DLL4 антитіла, відбирають, клонують, а потім скринують на потрібні властивості, включаючи стабільний ріст гібридом, високий рівень продукування антитіл і бажані властивості антитіл, як обговорюється нижче. Гібридами можуть бути культивовані і розмножені *in vivo* у сингенних тварин, у тварин, у яких відсутня імунна система, наприклад у "голих" мишей, або *in vitro* в клітинній культурі. Методи відбору, клонування і розмноження гібридом добре відомі середньому фахівцю в даній галузі.

У переважному варіанті винаходу гібридомами є мишачі гібридами, описані вище. У іншому варіанті винаходу гібридами продукують у тварин, що не є людиною або мишами, наприклад у таких тварин, як щури, вівці, свині, кози, велика рогата худоба або коні. У ще одному переважному варіанті винаходу, гібридомами є людські гібридами, в яких людська несекреторна мієлома гібридизована з людськими клітинами, експресуючими анти-DLL4 антитіло.

Фрагменти антитіл, що розпізнають специфічні епітопи, можуть бути одержані відомими методами. Так, наприклад, Fab- і F(ab')₂-фрагменти згідно з винаходом можуть бути одержані шляхом протеолітичного розщеплення молекул імуноглобуліну з використанням ферментів, таких як папаїн (для одержання Fab-фрагментів) або пепсин (для одержання F(ab')₂-фрагментів). F(ab')₂-фрагменти містять варіабельну область, константну область легкого ланцюга і домен CH1 важкого ланцюга.

2. Одержання анти-DLL4 моноклональних антитіл з використанням SLAM

У іншому аспекті винаходу рекомбінантні антитіла одержують з одиночних виділених лімфоцитів відповідно до процедури, званої фахівцями методом відбору антитілопродукуючих лімфоцитів (SLAM), описаним в патенті США № 5627052, в публікації заявки PCT WO 92/02551 і в публікації Babcock J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-7848 (1996). В цьому методі одиночні клітини, секретуючі антитіла, що представляють інтерес, наприклад лімфоцити, що походять від будь-якої імунізованої тварини, описаної в розділі I.A.1 (див. вище), скринують за допомогою аналізу методом антигенспецифічних гемолітичних бляшок, де антиген DLL4, субодиницю DLL4 або її фрагмент піддають взаємодії з баранячими еритроцитами за допомогою лінкера, такого як біотин, і використовують для ідентифікації одиночних клітин, секретуючих антитіла, специфічні до DLL4. Після

ідентифікації антитілосекретуючих клітин, що представляють інтерес, кДНК варіабельної області важкого і легкого ланцюгів витягують з клітин за допомогою ПЛР із зворотною транскриптазою (ЗТ-ПЛР), після чого такі варіабельні області можуть бути експресовані в оточенні відповідних константних областей імуноглобулінів (наприклад, людських константних областей) в клітинах-хазяїнах ссавців, таких як клітини COS або CHO. Ці клітини-хазяїни, трансфіковані ампліфікованими послідовностями імуноглобуліну, що походять від *in vivo* відібраних лімфоцитів, можуть бути піддані додатковому аналізу і відбору *in vitro*, наприклад, шляхом пенінгу трансфікованих клітин з метою виділення клітин, експресуючих антитіла проти DLL4. Потім ампліфіковані послідовності імуноглобуліну можуть бути модифіковані *in vitro*, наприклад методами афінного дозрівання *in vitro*. Див., наприклад, публікацію заявки РСТ WO 97/29131 і публікацію заявки РСТ WO 00/56772.

3. Одержання анти-DLL4 моноклональних антитіл з використанням трансгенних тварин

У іншому варіанті винаходу антитіла продукують шляхом імунізації тварини, яка не є людиною і містить деякими або всім локуси людських імуноглобулінів, антигеном DLL4. У переважному варіанті винаходу тварина, що не є людиною, являє собою трансгенну мишу XENOMOUSE®, тобто штучно сконструйований штам миші, який містить великі фрагменти локусів людського імуноглобуліну і є дефіцитним по продукуванню мишачого антитіла. Див., наприклад, Green et al., *Nature Genetics* 7:1 3-21 (1994), і патенти США №№ 5916771, 5939598, 5985615, 5998209, 6075181, 6091001, 6114598 і 6130364. Див. також публікації заявок РСТ WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560 і WO 00/037504. Трансгенна миша XENOMOUSE® продукує репертуар повністю людських антитіл, подібних антитілам дорослої людини, і генерує антигенспецифічні людські моноклональні антитіла. Трансгенна миша XENOMOUSE® містить приблизно 80% репертуару людських антитіл, що зумовлено введенням фрагментів локусів людського важкого ланцюга і х локусів людського легкого ланцюга, що мають розмір мегаоснов і конфігурацію зародкових ліній YAC. Див. публікації Mendez et al., *Nature Genetics* 15: 146-156 (1997), Green & Jakobovits J. *Exp. Med.* 188: 483-495 (1998), опис яких вводиться в даний документ за допомогою посилання.

4. Одержання анти-DLL4 моноклональних антитіл з використанням бібліотек рекомбінантних антитіл

Методи *in vitro* можуть бути також застосовані для одержання антитіл згідно з винаходом, де вказану бібліотеку антитіл скринують для ідентифікації антитіла, що має потрібну специфічність зв'язування з DLL4. Методи такого скринінгу бібліотек рекомбінантних антитіл добре відомі фахівцям і включають методи, описані, наприклад, в патенті США № 5223409 (Ladner et al.); в публікації заявки РСТ № WO 92/18619 (Kang et al.); в публікації заявки РСТ № WO 91/17271 (Dower et al.); в публікації заявки РСТ № WO 92/20791 (Winter et al.); в публікації заявки РСТ № WO 92/15679 (Markland et al.); в публікації заявки РСТ № WO 93/01288 (Breitling et al.); в публікації заявки РСТ № WO 92/01047 (McCafferty et al.); в публікації заявки РСТ № 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); Clackson 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 публікації заявки на патент США № 2003/0186374 і в публікації заявки РСТ № WO 97/29131, які вводяться в даний опис за допомогою посилання.

Бібліотека рекомбінантних антитіл може бути одержана у індивідуума, імунізованого DLL4 або частиною DLL4. Альтернативно, бібліотека рекомбінантних антитіл може бути одержана у індивідуума, що раніше не брав участі в експериментах, тобто у індивідуума, який не був імунізований DLL4, наприклад, може бути одержана бібліотека людських антитіл, що походить від людини, яка не була імунізована людським DLL4. Антитіла згідно з винаходом відбирають шляхом скринінгу бібліотеки рекомбінантних антитіл з використанням пептиду, що містить людський DLL4, з метою одержання антитіл, що розпізнають DLL4. Методи проведення такого скринінгу і відбору добре відомі фахівцям і описані в публікаціях, вказаних в попередньому параграфі. Для відбору антитіл згідно з винаходом, що мають конкретну афінність зв'язування з DLL4, таких як антитіла, які дисоціюють з людського DLL4 з конкретною константою швидкості дисоціації K_{off} , може бути застосований добре відомий метод поверхневого плазмонного резонансу, який дозволяє проводити відбір антитіл, що мають потрібну константу швидкості дисоціації K_{off} . Для відбору антитіл згідно з винаходом, що мають конкретну активність нейтралізації hDLL4, таких як антитіла з конкретним значенням IC_{50} , можуть бути застосовані стандартні методи, відомі фахівцям в галузі аналізу на інгібування активності DLL4.

У одному з аспектів даний винахід стосується виділеного антитіла або його антигензв'язувальної частини, які зв'язуються з людським DLL4. Переважним антитілом є нейтралізуюче антитіло. У різних варіантах винаходу вказаним антитілом є рекомбінантне антитіло або моноклональне антитіло. Так, наприклад, антитіла згідно з винаходом можуть бути також одержані різними методами фагового представлення, відомими фахівцям. У методах фагового представлення функціональні домени

антитіл представлені на поверхні фагових частинок, які несуть полінуклеотидні послідовності, що кодують ці домени. Такий фаг може бути використаний для представлення антигензв'язувальних доменів, експресованих з репертуару або комбінаторної бібліотеки антитіл (наприклад, людських або мишачих антитіл). Фаг, експресуючий антигензв'язувальний домен, який зв'язується з антигеном, що представляє інтерес, може бути відібраний або ідентифікований з використанням антигену, наприклад міченого антигену або антигену, зв'язаного з твердою поверхнею або сферою або іммобілізованого на цій поверхні або сфері. Фагом, використовуваним в цих методах, звичайно є нитчастий фаг, що включає зв'язувальні домени фагів fd і M13, експресовані з фага, що має домени Fab-фрагмента, Fv-фрагмента або стабілізованого дисульфідом Fv-фрагмента антитіл, рекомбінантно приєднані до білка фагового гена III або VIII. Репрезентативними методами фагового представлення, які можуть бути застосовані для одержання антитіл згідно з винаходом, є методи, описані 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 заявці PCT № PCT/GB91/01134; в публікаціях заявок PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; і в патентах США №№ 5698426; 5223409; 5403484; 5580717; 5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908; 5516637; 5780225; 5658727; 5733743 і 5969108, які у своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання.

Як описано в цитованих вище роботах, після відбору фага, антитілокодуючі області фага можуть бути виділені і використані для одержання повнорозмірних антитіл, включаючи людські антитіла або будь-який інший потрібний антигензв'язувальний фрагмент, і експресовані в будь-якому потрібному хазяїні, включаючи клітини ссавців, клітини комах, клітини рослин, дріжджі і бактерії, наприклад, детально описані нижче. Так, наприклад, способи рекомбінантного продукування Fab-, Fab'- і F(ab')₂-фрагментів можуть бути також виконані із застосуванням методів, відомих фахівцям, таких як методи, описані в публікації заявки PCT WO 92/22324 і в публікаціях Mullinax et al., *BioTechniques* 12(6): 864-869 (1992); і Sawai et al., *Am. J. Reprod. Immunol.* 34: 26-34 (1995); і Better et al., *Science* 240: 1041-1043 (1988) (вказані публікації у своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання). Прикладами методів, які можуть бути застосовані для продукування одноланцюжкових Fv-фрагментів і антитіл, є методи, описані в патентах США 4946778 і 5258498; і в публікаціях Huston et al., *Methods in Enzymology* 203: 46-88 (1991); Shu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7995-7999 (1993); і Skerra et al., *Science* 240: 1038-1041 (1988).

Як альтернатива скринінгу бібліотек рекомбінантних антитіл методом фагового представлення, використовуваному для ідентифікації антитіл згідно з винаходом, можуть бути застосовані і інші методи, відомі фахівцям в галузі скринінгу великих комбінаторних бібліотек. Одним з типів альтернативної експресійної системи є система, в якій бібліотеку рекомбінантних антитіл експресують у вигляді гібриду "РНК-білок", як описано в публікації заявки PCT WO 98/31700 (Szostak і Roberts) і в публікації Roberts & Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12297-12302 (1997). В цій системі ковалентне зв'язування здійснюється між мРНК і пептидом або білком, які вона кодує, за допомогою *in vitro* трансляції синтетичних мРНК, що несуть біля свого 3'-кінця пуроміцин, тобто антибіотик-акцептор пептидилу. Таким чином, специфічна мРНК може бути збагачена з комплексної суміші мРНК (наприклад, комбінаторної бібліотеки), виходячи з властивостей кодованого пептиду або білка, наприклад антитіла або його частини, таких як зв'язування антитіла або його частини з антигеном з подвійною специфічністю. Послідовності нуклеїнових кислот, кодуючі антитіла або їх частини, виявлені шляхом скринінгу вказаних бібліотек, можуть бути експресовані описаними тут рекомбінантними методами (наприклад, в клітинах-хазяїнах ссавців), і, крім того, вони можуть бути піддані подальшому афінному дозріванню шляхом проведення або додаткових раундів скринінгу гібридів "мРНК-пептид", де в їх спочатку відібрану(і) послідовність(ості) були введені мутації, або іншими методами афінного дозрівання рекомбінантних антитіл *in vitro*, описаними вище. Переважним прикладом такої методики є технологія представлення PROfusion, використовувана в Прикладах (див. нижче).

У іншому підході, антитіла згідно з винаходом можуть бути також одержані методами дріжджового представлення, відомими фахівцям. У методах дріжджового представлення, для зв'язування доменів антитіл зі стінками дріжджових клітин і їх представлення на поверхні дріжджів застосовуються генетичні методи. Зокрема, такі дріжджі можуть бути використані для представлення антигензв'язувальних доменів, експресованих з репертуару або комбінаторної бібліотеки антитіл (наприклад, людських або мишачих антитіл). Прикладами методів дріжджового представлення, які можуть бути застосовані для одержання антитіл згідно з винаходом, є методи, описані в патенті США № 6699658 (Wittrup et al.), який вводиться в даний опис за допомогою посилання.

В. Продукування рекомбінантних анти-DLL4 антитіл

Антитіла згідно з винаходом можуть бути продуковані будь-якими методами, відомими фахівцям. Так, наприклад, експресію в клітинах-хазяїнах, де експресійний(і) вектор(и), що кодує(ють) важкий і легкий ланцюги, був(ли) перенесений(і) у вказану клітину-хазяїна, здійснюють стандартними

методами. Різні форми терміна "трансфекція" охоплюють широкий ряд методів, звичайно застосовуваних для введення екзогенної ДНК в прокаріотичні або еукаріотичні клітини-хазяїни, наприклад, електропорацію, осадження фосфатом кальцію, трансфекцію, опосередковувану DEAE-декстраном, і т. п. Хоч антитіла згідно з винаходом можуть експресуватися в прокаріотичних або еукаріотичних клітинах-хазяїнах, однак, переважною є експресія антитіл в еукаріотичних клітинах, а найбільш переважно в клітинах-хазяїнах ссавців, оскільки такі еукаріотичні клітини (зокрема, клітини ссавців) з більшою імовірністю, ніж прокаріотичні клітини, будуть піддаватися злиттю і секретувати "правильно" укладене і імунологічно активне антитіло.

Переважними клітинами-хазяїнами ссавців, використовуваними для експресії рекомбінантних антитіл згідно з винаходом, є клітини яєчника китайського хом'ячка (клітини CHO) (включаючи клітини dhfr-CHO, описані Urlaub і Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220 (1980)), використовувані разом з DHFR-селективним маркером, наприклад, як описано Kaufman і Sharp J. Mol. Biol. 159: 601-621 (1982), клітини мієломи NSO, клітини COS і клітин SP2. Після введення рекомбінантних експресійних векторів, що містять гени антитіл, в клітини-хазяїни ссавців, антитіла одержують шляхом культивування клітин-хазяїнів протягом періоду часу, достатнього для експресії антитіла в клітинах-хазяїнах або, більш переважно, секреції антитіла в культуральне середовище, в якому вирощують клітини-хазяїни. Антитіла можуть бути виділені з культурального середовища стандартними методами очищення білків.

Клітини-хазяїни можуть бути також використані для продукування функціональних фрагментів антитіла, таких як Fab-фрагменти або молекули scFv. Абсолютно очевидно, що в обсяг даного винаходу входять варіанти вищеописаних процедур. Так, наприклад, може виявитися бажаною трансфекція клітин-хазяїнів ДНК, що кодує функціональні фрагменти легкого ланцюга і/або важкого ланцюга антитіла згідно з винаходом. Техніка рекомбінантних ДНК може бути також застосована для видалення деяких або всіх ДНК, що кодують легкий або важкий ланцюг або обидва цих ланцюги, які не є необхідними для зв'язування з антигенами, що представляють інтерес. У обсяг терміна "антитіла згідно з винаходом" також входять молекули, експресовані такими усіченими молекулами ДНК. Крім того, можуть бути продуковані біфункціональні антитіла, в яких один важкий ланцюг і один легкий ланцюг являють собою антитіло згідно з винаходом, а інші важкий і легкий ланцюги є специфічними до антигену, що не представляє інтерес з точки зору даного винаходу, де вказаний спосіб продукування здійснюють шляхом перехресного зшивання антитіла згідно з винаходом з другим антитілом стандартними хімічними методами перехресного зшивання.

У переважній системі рекомбінантної експресії антитіла або його антигензв'язувальної частини згідно з винаходом, рекомбінантний експресійний вектор, що кодує важкий ланцюг і легкий ланцюг антитіла, вбудовують в клітини dhfr-CHO методом трансфекції, опосередкованої фосфатом кальцію. У рекомбінантному експресійному векторі гени важкого і легкого ланцюгів антитіла функціонально приєднані до регуляторних елементів "енхансер CMV/промотор AdMLP", що приводить до запуску транскрипції генів на високому рівні. Рекомбінантний експресійний вектор також несе ген DHFR, що дозволяє проводити відбір клітин CHO, трансформованих вектором, шляхом їх культивування в присутності метотрексату/ампліфікації. Відібрані трансформовані клітини-хазяїни культивують для експресії важкого і легкого ланцюгів антитіла, і з культурального середовища виділяють інтактне антитіло. Для одержання рекомбінантного експресійного вектора і для трансфекції клітин-хазяїнів, відбору трансформантів, культивування клітин-хазяїнів і виділення антитіла з культурального середовища застосовують стандартні методи молекулярної біології. Даний винахід також стосується способу синтезу рекомбінантного антитіла згідно з винаходом шляхом культивування клітин-хазяїнів згідно з винаходом у придатному культуральному середовищі з одержанням рекомбінантного антитіла згідно з винаходом. Цей спосіб може також включати виділення рекомбінантного антитіла з культурального середовища.

1. Анти-DLL4 антитіла

Амінокислотні послідовності VH- і VL-областей виділених повністю людських антитіл, які зв'язуються з людським DLL4, представлені для клонів E9 і A10 в таблиці 4 (див. нижче в розділі "Приклади"). Було встановлено, що ізольовані послідовності CDR анти-DLL4 антитіл E9 і A10 належать до двох нових сімейств DLL4-зв'язувальних білків, виділених відповідно до даного винаходу, і містять поліпептиди, які включають послідовності CDR, що походять від E9 і його афінно зрілих клонів, і послідовності CDR, що походять від A10 і його афінно зрілих клонів. Варіабельні області і CDR моноклонального антитіла E9 і його афінно зрілих похідних вказані в таблицях 4, 8, 14, 18 і 19. Варіабельні області і CDR моноклонального антитіла A10 і його афінно зрілих похідних вказані в таблицях 4, 9 і 10. Для продукування і для відбору CDR з метою одержання білків, що зв'язуються, згідно з винаходом, що мають переважну активність зв'язування з DLL4 і/або нейтралізації DLL4, а саме людського DLL4, можуть бути застосовані відомі стандартні методи одержання білків, що зв'язуються, згідно з винаходом і оцінки здатності цих білків, що зв'язуються, зв'язуватися з DLL4 і/або нейтралізувати їх активність, включаючи, але не обмежуючись ними, методи, конкретно описані в даній заявці.

Виходячи з результатів зіставлення амінокислотних послідовностей CDR варіабельних областей важкого ланцюга (VH) і варіабельних областей легкого ланцюга (VL) клонів анти-DLL4 антитіла E9, описаних в даній заявці, був одержаний DLL4-зв'язувальний білок згідно з винаходом, що містить антигензв'язувальний домен, здатний зв'язуватися з людським DLL4, де вказаний антигензв'язувальний домен містить щонайменше одну або декілька CDR, вибраних з групи, що складається з:

CDR-H1: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (SEQ ID NO: 99), де:

X₁ являє собою S або N;
 X₂ являє собою S, G або N;
 X₃ являє собою S, N, T, G або R;
 X₄ являє собою Y;
 X₅ являє собою Y або H;
 X₆ являє собою W; i
 X₇ являє собою G;

CDR-H2: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆ (SEQ ID NO: 100), де:

X₁ являє собою D;
 X₂ являє собою I;
 X₃ являє собою Y, N або S;
 X₄ являє собою Y;
 X₅ являє собою T, N, A, I, S або R;
 X₆ являє собою G;
 X₇ являє собою S, N, T або G;
 X₈ являє собою T;
 X₉ являє собою Y;
 X₁₀ являє собою Y;
 X₁₁ являє собою N;
 X₁₂ являє собою P;
 X₁₃ являє собою S;
 X₁₄ являє собою L;
 X₁₅ являє собою K; i
 X₁₆ являє собою S, N, D або G;

CDR-H3: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁ (SEQ ID NO: 101), де:

X₁ являє собою E, Y, F, Q, W, L або A;
 X₂ являє собою D, A, S, G, V, E або N;
 X₃ являє собою V, M, L, P або A;
 X₄ являє собою I, A, P, R, S, K, Q, V, G, M або E;
 X₅ являє собою L, Y, F або M;
 X₆ являє собою R, G, S, Q або A;
 X₇ являє собою G;
 X₈ являє собою G, A або S;
 X₉ являє собою S, A, L, V, R або G;
 X₁₀ являє собою D; i

X₁₁ являє собою Y, D, S, N, H, E, R, L, P, C, I, M, T, Q або K;

CDR-L1: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁ (SEQ ID NO: 102), де:

X₁ являє собою S;
 X₂ являє собою G;
 X₃ являє собою Q, E або D;
 X₄ являє собою R, S, G, M, K, L або T;
 X₅ являє собою L;
 X₆ являє собою G;
 X₇ являє собою D або E;
 X₈ являє собою K;
 X₉ являє собою Y;
 X₁₀ являє собою A або V; i

X₁₁ являє собою S;

CDR-L2: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (SEQ ID NO: 103), де:

X₁ являє собою E або Q;
 X₂ являє собою D;
 X₃ являє собою S, L, T, A, E або F;
 X₄ являє собою K, T, E, N, Q, S або M;
 X₅ являє собою R;
 X₆ являє собою P; i

X₇ являє собою S; i

CDR-L3: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉ (SEQ ID NO: 104), де:

X₁ являє собою Q;

X₂ являє собою A;

X₃ являє собою W;

X₄ являє собою D;

X₅ являє собою R, S, M, E, N, G або K;

X₆ являє собою D або E;

X₇ являє собою T, V, A, S або M;

X₈ являє собою G, A або C; i

X₉ являє собою V.

Переважно, DLL4-зв'язувальний білок, що містить одну або декілька вищеописаних CDR, зв'язується з людським ("hu", "h") DLL4, а також з одним або декількома білками DLL4, вибраними з групи, що складається з мишачого ("mu") DLL4, DLL4 яванського макака ("cyno") і щурячого DLL4.

Виходячи з результатів зіставлення амінокислотних послідовностей CDR варіабельних областей важкого ланцюга (VH) і варіабельних областей легкого ланцюга (VL) клонів анти-DLL4 антитіла A10, описаних в даній заявці, був одержаний DLL4-зв'язувальний білок згідно з винаходом, що містить антигензв'язувальний домен, здатний зв'язуватися з людським DLL4, де вказаний антигензв'язувальний домен містить щонайменше одну або декілька CDR, вибраних з групи, що складається з:

CDR-H1: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅ (SEQ ID NO: 105), де:

X₁ являє собою S, N або D;

X₂ являє собою H або Y;

X₃ являє собою W;

X₄ являє собою M; i

X₅ являє собою S або H;

CDR-H2: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆-X₁₇ (SEQ ID NO: 106), де:

X₁ являє собою I, D, M або T;

X₂ являє собою I;

X₃ являє собою S;

X₄ являє собою Y, N, S, Q, V, T, H або D;

X₅ являє собою D;

X₆ являє собою G;

X₇ являє собою S, R, I, T, G, K, H або N;

X₈ являє собою N, Y, S, I або T;

X₉ являє собою K, M, N, Q, E, T, R, S, A або L;

X₁₀ являє собою Y, D або E;

X₁₁ являє собою S або Y;

X₁₂ являє собою A;

X₁₃ являє собою D;

X₁₄ являє собою S;

X₁₅ являє собою V;

X₁₆ являє собою K; i

X₁₇ являє собою G;

CDR-H3: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀ (SEQ ID NO: 107), де:

X₁ являє собою A;

X₂ являє собою G, A або R;

X₃ являє собою G;

X₄ являє собою G, S або A;

X₅ являє собою N;

X₆ являє собою V або M;

X₇ являє собою G;

X₈ являє собою F, L, Y або M;

X₉ являє собою D; i

X₁₀ являє собою I, S або L;

CDR-L1: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁ (SEQ ID NO: 108), де:

X₁ являє собою S;

X₂ являє собою A або G;

X₃ являє собою D;

X₄ являє собою K, N, L, Q, M, E, S, T, G або D;

X₅ являє собою L;

X₆ являє собою G;

X₇ являє собою T, S, N, A, G або E;

X₈ являє собою K, Q, N або R;

X₉ являє собою Y;

X₁₀ являє собою V або I; i

X₁₁ являє собою S;

CDR-L2: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇ (SEQ ID NO: 109), де:

X₁ являє собою Q;

X₂ являє собою D;

X₃ являє собою A, G, W, S або D;

X₄ являє собою K, M, Q, N, L, T, I або E;

X₅ являє собою R;

X₆ являє собою P;

X₇ являє собою S; i

CDR-L3: X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉ (SEQ ID NO: 110), де:

X₁ являє собою Q;

X₂ являє собою S або A;

X₃ являє собою W;

X₄ являє собою D;

X₅ являє собою R, S, Q, P, A, V, W або M;

X₆ являє собою S, G, I, N, R або T;

X₇ являє собою D або G;

X₈ являє собою V, A, P або E; i

X₉ являє собою V.

Переважно, DLL4-зв'язувальний білок, що містить одну або декілька вищеописаних CDR, зв'язується з людським ("hu") DLL4, а також з DLL4 яванського макака ("супо").

2. Химерні анти-DLL4 антитіла

Химерне антитіло являє собою молекулу, в якій різні частини антитіла походять від тварин різних видів, і таке антитіло має варіабельну область, що походить від мишачого моноклонального антитіла, і константну область людського імуноглобуліну. Див., наприклад, Morrison, Science, 229: 1202-1207 (1985); Oi et al., BioTechniques, 4: 214 (1986); Gillies et al., J. Immunol. Methods, 125: 191-202 (1989); патенти США №№ 5807715, 4816567 і 4816397, які у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання. Крім того, можуть бути застосовані методи продукування "химерних антитіл" шляхом сплайсингу генів молекули мишачого антитіла, що має відповідну специфічність до антигену, разом з генами молекули людського антитіла, що має відповідну біологічну активність. Див., наприклад, публікації 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), які у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання.

3. CDR-прищеплені анти-DLL4 антитіла

Ізольовані послідовності CDR анти-DLL4 антитіла згідно з винаходом можуть бути використані для одержання CDR-прищеплених антитіл з метою модуляції властивостей вихідного антитіла. Такими властивостями є, але не обмежуються ними, кінетика зв'язування, афінність, біологічна активність, видова перехресна реактивність, молекулярна видова перехресна реактивність, епітоп, фізико-хімічні властивості, фармакокінетичні властивості, фармакодинамічні властивості або фармакологічні властивості. CDR-прищеплені антитіла містять послідовності варіабельної області важкого і легкого ланцюгів, що походять від людського антитіла або антитіла приматів, що не є людиною, де одна або декілька областей CDR ланцюга VH і/або VL замінені CDR-послідовностями вихідного анти-DLL4 антитіла. Каркасна послідовність, що походить від будь-якого людського антитіла або антитіла приматів, що не є людиною, може служити як матриця для приєднання CDR. Однак заміна прямого ланцюга на таку каркасну послідовність часто приводить до деякої втрати афінності зв'язування з антигеном. Чим більше гомологія людського антитіла або антитіла тварини іншого виду з вихідним людським антитілом, тим менше імовірність того, що об'єднання CDR з новою людською каркасною областю або каркасною областю приматів, що не є людиною, буде вносити зміни в CDR, що приводять до зниження афінності або до погіршення інших властивостей. Тому, переважно, щоб варіабельна каркасна область, вибрана для заміни людської варіабельної каркасної області, не включаючи CDR, була щонайменше на 30% ідентична каркасній варіабельній області людського антитіла. Більш переважно, щоб варіабельна каркасна область, вибрана для заміни людської варіабельної каркасної області, не включаючи CDR, була щонайменше на 40% ідентична каркасній варіабельній області людського антитіла. Більш переважно, щоб варіабельна каркасна область, вибрана для заміни людської варіабельної каркасної області, не включаючи CDR, була щонайменше на 50% ідентична каркасній варіабельній області людського антитіла. Більш переважно, щоб варіабельна каркасна область, вибрана для заміни людської варіабельної каркасної області, не включаючи CDR, була щонайменше на 60% ідентична каркасній варіабельній області людського

антитіла. Більш переважно, щоб нова каркасна область варіабельної області людини або приматів, що не є людиною, і вихідна людська варіабельна каркасна область, не включаючи CDR, мали послідовності, ідентичні щонайменше на 70%. Більш переважно, щоб нова каркасна область варіабельної області людини або приматів, що не є людиною, і вихідна людська варіабельна каркасна область, не включаючи CDR, мали послідовності, ідентичні щонайменше на 75%. І найбільш переважно, щоб нова каркасна область варіабельної області людини або приматів, що не є людиною, і вихідна людська варіабельна каркасна область, не включаючи CDR, мали послідовності, ідентичні щонайменше на 80%. Навіть при використанні у високій мірі гомологічних каркасних людських послідовностей і послідовностей приматів, що не є людиною, для приєднання до CDR вихідного людського анти-DLL4 антитіла, одержане прищеплене антитіло може до деякої міри втрачати афінність зв'язування з антигеном. У цьому випадку, для відновлення афінності необхідно включити щонайменше одну або декілька заміни ключових каркасних залишків вихідного антитіла у відповідне положення одержаного прищепленого антитіла. Такий ключовий залишок може бути вибраний з групи, що складається з:

- залишку, суміжного з CDR;
- залишку сайту глікозилювання;
- рідкого залишку;
- залишку, здатного взаємодіяти з людським DLL4;
- канонічного залишку;
- залишку, розташованого в зоні контактування варіабельної області важкого ланцюга з варіабельною областю легкого ланцюга;
- залишку в зоні Верньєра; і
- залишку в області, яка перекривається з областю CDR1 варіабельного важкого ланцюга, визначеною по Чотіа, і з першою каркасною областю важкого ланцюга, визначеною по Кебату.

4. Гуманізовані анти-DLL4 антитіла

Хоч для композицій згідно з винаходом не потрібне одержання гуманізованих антитіл, однак, такі гуманізовані анти-DLL4 антитіла можуть бути одержані з використанням композицій згідно з винаходом. Гуманізовані антитіла являють собою молекули антитіл, що походять від антитіл нелюдських видів, які зв'язуються з потрібним антигеном, і мають одну або декілька гіперваріабельних областей (CDR), що походять від нелюдських видів, і каркасні області молекули людського імуноглобуліну. Відомі послідовності людських Ig описані, наприклад, в інтернеті на web-сайтах (www.), наприклад, ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi;

- atcc.org/phage/hdb.html;
- sciquest.com/;
- abcam.com/;
- antibodyresource.com/onlinecomp.html;
- public.iastate.edu/about.pedro/research_tools.html;
- mgen.uniheidelberg.de/SD/IT/IT.html;
- whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm;
- library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;
- hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/;
- path.-cam.ac.Uk/about.mrc7/mikeimages.html;
- antibodyresource.com/;
- mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html;
- immunologylink.com/;
- pathbox.wustl.edu/about.hcenter/index.html;
- biotech.ufl.edu/about.hcl/;
- pebio.com/pa/340913-/340913.html;
- nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;
- m.ehimeu.ac.jp/about.yasuhito/Elisa.html;
- biodesign.com/table.asp;
- icnet.uk/axp/facs/davies/lin-ks.html;
- biotech.ufl.edu/-/about.fccl/protocol.html;
- isac-net.org/sites_geo.html;
- aximtl.imt.uni-marburg.de/about.rek/AEP-Start.html;
- baserv.uci.kun.nl/about.jraats/linksl.html;
- recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/;
- mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html;
- ibt.unam.mx/vir/V_mice.html;
- imgt.cnusc.fr:8104/;
- biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html;
- antibody.bath.ac.uk/;

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/TAHHP.html;
 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. Dept. Health (1983), які у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання. Такі "імпортні" послідовності можуть бути використані для зниження імуногенності або для зниження, посилення або модифікації зв'язування, афінності, швидкості асоціації, швидкості дисоціації, авідності, специфічності, часу напівжиття або будь-яких інших придатних властивостей, відомих фахівцям.

Каркасні залишки в людських каркасних областях можуть бути замінені відповідним залишком донорного антитіла з CDR з метою зміни, наприклад поліпшення, зв'язування з антигеном. Такі каркасні заміни ідентифікують методами, добре відомими фахівцям, наприклад, шляхом моделювання взаємодій CDR і каркасних залишків з метою ідентифікації каркасних залишків, що грає важливу роль в зв'язуванні з антигеном, і порівняння послідовностей з метою ідентифікації каркасних залишків, що рідко зустрічаються, в конкретних положеннях (див., наприклад, патент США № 5585089 (Queen et al.); і публікацію Riechmann et al., Nature 332: 323-327 (1988), які у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання). Тривимірні моделі імуноглобулінів є загальнодоступними і відомі фахівцям в даній галузі. Існують комп'ютерні програми, які ілюструють і представляють вірогідні тривимірні конформаційні структури вибраних послідовностей-кандидатів імуноглобуліну. Аналіз таких представлень дозволяє визначити вірогідну роль цих залишків в функціонуванні послідовності-кандидата імуноглобуліну, тобто виявити залишки, що впливають на здатність імуноглобуліну-кандидата зв'язуватися з антигеном. Таким чином, залишки FR можуть бути вибрані з консенсусних послідовностей і "імпортних" послідовностей і об'єднані так, щоб одержати антитіло з бажаними властивостями, такими як підвищена афінність відносно антигену(ів)-мішені(ей). У загальних рисах, залишки CDR безпосередньо і найвищою мірою впливають на зв'язування з антигеном. Антитіла можуть бути гуманізовані різними методами, відомими фахівцям, такими як, але не обмежуються ними, методи, описані в публікаціях Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Verhoeyen 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), 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 публікації PCT №№ WO 91/09967, WO 99/06834 (PCT/US98/16280), WO 97/20032 (PCT/US96/18978), WO 92/11272 (PCT/US91/09630), WO 92/03461 (PCT/US91/05939), WO 94/18219 (PCT/US94/01234), WO 92/01047 (PCT/GB91/01134), WO 93/06213 (PCT/GB92/01755), WO90/14443, WO90/14424 і WO90/14430; в публікаціях Європейських патентних заявок №№ EP059106, EP0519596 і EP0239400; в патентах США №№ 5565332, 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539 і 4816567, які у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання, включаючи роботи, цитовані там.

С. Одержання антитіл і антитілопродукуючих клітинних ліній

Анти-DLL4 антитіла згідно з винаходом переважно мають високу здатність знижувати або нейтралізувати активність пухлин відносно ангиогенезу, оцінювану, наприклад, за допомогою будь-якого з декількох існуючих аналізів *in vitro* і *in vivo*, відомих фахівцям. Оцінка нейтралізації активності DLL4 може бути проведена за допомогою декількох *in vitro* і *in vivo* аналізів, відомих фахівцям. Репрезентативними параметрами для оцінки нейтралізації активності DLL4 є, але не обмежуються ними, антитіла, які інгібують взаємодію DLL4 з рецептором Notch і/або шлях передачі сигналу Notch при величинах IC₅₀, що складають приблизно щонайменше 10⁻⁶ М, щонайменше 10⁻⁷ М або щонайменше 10⁻⁸ М.

Переважно, анти-DLL4 антитіла згідно з винаходом також мають високу здатність знижувати або нейтралізувати активність DLL4.

У переважних варіантах винаходу ізольоване антитіло або його антигензв'язувальна частина зв'язується з людським DLL4, де вказане антитіло або його антигензв'язувальна частина дисоціюється з людського DLL4 з константою швидкості дисоціації K_{off} приблизно 0,1 с⁻¹ або менше, як було визначено методом поверхневого плазмонного резонансу, або інгібує DLL4 і/або активність людського DLL4 з IC₅₀ приблизно 1×10⁻⁶ М або менше. Альтернативно, вказане антитіло або його антигензв'язувальна частина можуть дисоціюватися з людського DLL4 з константою швидкості дисоціації K_{off} приблизно 1×10⁻² с⁻¹ або менше, як було визначено методом поверхневого плазмонного

резонансу, або можуть інгібувати людський DLL4 і/або активність людського DLL4 з IC_{50} приблизно 1×10^{-7} М або менше. Альтернативно, вказане антитіло або його антигензв'язувальна частина можуть дисоціюватися з людського DLL4 з константою швидкості дисоціації K_{off} приблизно $1 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ або менше, як було визначено методом поверхневого плазмонного резонансу, або можуть інгібувати людський DLL4 з IC_{50} приблизно 1×10^{-8} М або менше. Альтернативно, вказане антитіло або його антигензв'язувальна частина можуть дисоціюватися з людського DLL4 з константою швидкості дисоціації K_{off} приблизно $1 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ або менше, як було визначено методом поверхневого плазмонного резонансу, або можуть інгібувати активність людського DLL4 з IC_{50} приблизно 1×10^{-9} М або менше. Альтернативно, вказане антитіло або його антигензв'язувальна частина можуть дисоціюватися з людського DLL4 з константою швидкості дисоціації K_{off} приблизно $1 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$ або менше, як було визначено методом поверхневого плазмонного резонансу, або можуть інгібувати DLL4 і/або активність людського DLL4 з IC_{50} приблизно 1×10^{-10} М або менше. Альтернативно, вказане антитіло або його антигензв'язувальна частина можуть дисоціюватися з людського DLL4 з константою швидкості дисоціації K_{off} приблизно $1 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$ або менше, як було визначено методом поверхневого плазмонного резонансу, або можуть інгібувати DLL4 і/або активність людського DLL4 з IC_{50} приблизно 1×10^{-11} М або менше.

У деяких варіантах винаходу антитіло містить константну область важкого ланцюга, таку як константна область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM або IgD. Переважно, константна область важкого ланцюга являє собою константну область важкого ланцюга IgG1 або константну область важкого ланцюга IgG4. Крім того, вказане антитіло може містити константну область легкого ланцюга, тобто або константну область легкого ланцюга каппа, або константну область легкого ланцюга лямбда. Переважно, вказане антитіло містить константну область легкого ланцюга каппа. Альтернативно, частина антитіла може являти собою, наприклад, Fab-фрагмент або одноланцюжковий Fv-фрагмент.

Заміни амінокислотних залишків в Fc-частині, що вводяться для зміни ефекторної функції антитіла, відомі фахівцям (див. патенти США №№ 5648260 і 5624821 (Winter et al.)). Fc-частина антитіла опосередковує декілька важливих ефекторних функцій, наприклад індукування цитокінів, ADCC, фагоцитоз, комплементзалежну цитотоксичність (CDC), час напівжиття/швидкість кліренсу антитіла і утворення комплексів антиген-антитіло. У деяких випадках бажано, щоб терапевтичне антитіло мало ці ефекторні функції, але в інших випадках, залежно від терапевтичного застосування, такі функції можуть бути необов'язковими або навіть небажаними. Деякі ізотипи людських IgG, зокрема IgG1 і IgG3, опосередковують ADCC і CDC за допомогою зв'язування з FcγR і з комплементом C1q, відповідно. Fc-рецептори у новонароджених (FcRn) являють собою важливі компоненти, що визначають час напівжиття антитіл в крові. У іншому варіанті винаходу щонайменше один амінокислотний залишок в константній області антитіла, наприклад в Fc-області антитіла, замінюють так, щоб це приводило до зміни ефекторних функцій антитіла.

У одному з варіантів даний винахід стосується міченого зв'язувального білка, де вказані антитіло або частина антитіла згідно з винаходом дериватизовані іншою функціональною молекулою (наприклад, іншим пептидом або білком) або зв'язані з такою молекулою. Так, наприклад, мічений зв'язувальний білок згідно з винаходом може бути дериватизований шляхом функціонального приєднання антитіла або частини антитіла згідно з винаходом (шляхом хімічної взаємодії, генетичного злиття, нековалентного зв'язування або т. п.) до однієї або декількох інших молекул, таких як інше антитіло (наприклад, біспецифічне антитіло або діантитіло), детектований агент, цитотоксичний засіб, фармацевтичний засіб і/або білок або пептид, які можуть опосередковувати зв'язування антитіла або його частини з іншою молекулою (такою як корова область стрептавідину або полігістидинова мітка).

Придатними детектованими агентами, якими може бути дериватизоване антитіло або частина антитіла згідно з винаходом, є флуоресцентні сполуки. Репрезентативними детектованими флуоресцентними сполуками є флуоресцеїн, флуоресцеїну ізотіоціанат, родамін, 5-диметиламін-1-нафталінсульфонілхлорид, фікоеритрин і т. п. Антитіло може бути також дериватизоване детектованими ферментами, такими як лужна фосфатаза, пероксидаза хрому, глюкозооксидаза і т. п. Якщо антитіло дериватизоване детектованим ферментом, то він може бути детектований шляхом додавання допоміжних реагентів, які використовуються ферментом для продукування детектованого реакційного продукту. Так, наприклад, якщо таким детектованим агентом є пероксидаза хрому, то додавання пероксиду водню і діамінобензидину приводить до утворення забарвленого реакційного продукту, який є детектованим. Антитіло може бути також дериватизоване біотином і детектоване шляхом посереднього вимірювання рівня зв'язування з авідином або стрептавідином.

У іншому варіанті даний винахід стосується кристалізованого DLL4-зв'язувального білка. У переважному варіанті даний винахід стосується кристалів описаних тут DLL4-зв'язувальних білків, включаючи повнорозмірні анти-DLL4 антитіла, їх фрагменти, а також конструкції антитіл і кон'югати зв'язувальних білків (включаючи кон'югати антитіл), описані в даній заявці, і складів і композицій, що містять такі кристали. У одному з варіантів винаходу кристалізований зв'язувальний білок має більш

тривалий час напівжиття *in vivo*, ніж його розчинний аналог. У іншому варіанті винаходу зв'язувальний білок зберігає біологічну активність після кристалізації. Кристалізовані зв'язувальні білки згідно з винаходом можуть бути одержані методами, відомими фахівцям і описаними в публікації заявки РСТ WO 02/72636, яка вводиться в даний опис за допомогою посилання.

У іншому варіанті даний винахід стосується глікозилизованого зв'язувального білка, де антитіло або його антигензв'язувальна частина містять один або декілька вуглеводних залишків. Зростаючий ланцюг білка при його продукуванні *in vivo* може потім піддаватися процесингу, відомому як посттрансляційна модифікація. Зокрема, цукрові (глікозильні) залишки можуть бути приєднані ферментативно, способом, відомим як глікозилювання. Одержані білки, що несуть ковалентно зв'язані олігосахаридні бічні ланцюги, відомі як глікозилизовані білки або глікопротеїни. Глікозилювання білка залежить від амінокислотної послідовності білка, яка представляє інтерес, а також від типу клітини-хазяїна, в якій експресується такий білок. Різні організми можуть продукувати різні глікозилюючі ферменти (наприклад, глікозилтрансферази і глікозидази) і мають різні доступні субстрати (нуклеотидні цукри). Завдяки таким факторам характер глікозилювання білка і склад глікозильних залишків можуть варіювати залежно від системи хазяїна, в якій експресується конкретний білок. Глікозильними залишками, використовуваними в даному винаході, є, але не обмежуються ними, залишки глюкози, галактози, манози, фукози, N-ацетилглюкозаміну і сілової кислоти. Переважно, глікозилований зв'язувальний білок містить глікозильні залишки, що мають характер глікозилювання, спостережуваний у людини.

Фахівцю в даній галузі відомо, що зміна характеру глікозилювання білка може приводити до зміни властивостей білка. Так, наприклад, ефективність терапевтичного білка, продукованого в мікроорганізмі-хазяїні, такому як дріжджі, і глікозилизованого по ендogenousному дріжджовому шляху, може бути нижче, ніж ефективність того ж самого білка, експресованого в клітинах ссавців, таких як клітинна лінія CHO. Такі глікопротеїни можуть бути також імуногенними для людини і мають зменшений час напівжиття *in vivo* після введення. Специфічні рецептори у людини і інших тварин можуть розпізнавати специфічні глікозильні залишки і стимулювати швидке виведення білка з кровотоку. Іншими побічними ефектами можуть бути зміна укладання білка, його розчинності, чутливості до протеаз, перенесення, транспорту, компартменталізації, секреції, розпізнавання іншими білками або факторами, а також антигенності або алергенності. Відповідно до цього, практичний лікар може вибрати терапевтичний білок, що має конкретний склад і характер глікозилювання, наприклад білок, в якому склад і характер глікозилювання ідентичні або щонайменше аналогічні складу або характеру глікозилювання білка, продукованого в людських клітинах або у видоспецифічних клітинах тварини, що розглядається.

Експресія глікозилованих білків, відмінних від білків клітин-хазяїнів, може бути досягнута шляхом генетичної модифікації клітин-хазяїнів, здійснюваної так, щоб ці клітини-хазяїни експресували гетерологічні глікозилюючі ферменти. З застосуванням відомої техніки фахівець-практик може самостійно одержати антитіла або їх антигензв'язувальні частини, що мають характер глікозилювання, властивий людському білку. Так, наприклад, дріжджові штами були генетично модифіковані з метою експресії неприродних глікозилюючих ферментів, так, щоб глікозиловані білки (глікопротеїни), продуковані в цих дріжджових штаммах, мали характер глікозилювання білка, ідентичний характеру глікозилювання, властивому клітинам тварин, зокрема людським клітинам (див. публікації заявок на патент США №№ 2004/0018590 і 2002/0137134).

Крім того, для фахівця в даній галузі очевидно, що білок, що представляє інтерес, може бути експресований з використанням бібліотеки клітин-хазяїнів, генетично сконструйованих з метою здійснення експресії різних глікозилюючих ферментів, для того, щоб члени бібліотеки клітин-хазяїнів продукували білок, що представляє інтерес, який має змінений характер глікозилювання. Фахівець-практик може потім самостійно вибрати і виділити білок, що представляє інтерес, який має конкретний новий характер глікозилювання. При цьому переважно, щоб білок, який має конкретно вибраний новий характер глікозилювання, мав поліпшені або змінені біологічні властивості.

D. Застосування DLL4-зв'язувальних білків

Враховуючи здатність зв'язуватися з людським DLL4 і з мишачим DLL4, потрібно зазначити, що описані тут DLL4-зв'язувальні білки, включаючи антитіла і їх частини, можуть бути використані для детектування або вимірювання рівня DLL4 в зразку (наприклад, в суміші, в розчині або в біологічному зразку, такому як кров, сироватка або плазма) за допомогою будь-якого зі стандартних імуноаналізів, відомих фахівцям, таких як твердофазні імуноферментні аналізи (ELISA), радіоімуноаналіз (RIA) або імуногістохімічний аналіз тканини. Даний винахід стосується способу детектування людського DLL4 і/або мишачого DLL4 в зразку, де вказаний спосіб включає контактування зразка з DLL4-зв'язувальним білком і детектування DLL4-зв'язувального білка, зв'язаного з людським DLL4 і/або мишачим DLL4, або незв'язаного зв'язувального білка з метою визначення рівня людського DLL4 і/або мишачого DLL4 в зразку. Описаний тут DLL4-зв'язувальний білок може бути прямо або опосередковано помічений детектованою речовиною для полегшення детектування зв'язаного або незв'язаного DLL4-зв'язувального білка. Придатними детектованими речовинами є різні ферменти, простетичні групи, флуоресцентні речовини, люмінесцентні речовини і радіоактивні речовини. Прикладами придатних

ферментів є пероксидаза хрому, лужна фосфатаза, β -галактозидаза або ацетилхолінестераза; прикладами придатних комплексів з простетичними групами є стрептавідин/біотин і авідин/біотин; прикладами придатних флуоресцентних речовин є умбеліферон, флуоресцеїн, флуоресцеїну ізотіоціанат, родамін, дихлортриазиніламін флуоресцеїну, дансилхлорид або фікоеритрин; прикладом люмінесцентної речовини є люмінол, а прикладами придатних радіоактивних речовин є ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho або ^{153}Sm .

Біологічними зразками, які можуть бути оцінені на DLL4, є сеча, фекалії, кров, сироватка, плазма, піт, слина, мазок з ротової порожнини (щічний мазок, мазок з язика або із зіву), вагінальний мазок, мазок з прямої кишки, шкірний мазок, зскрібок зі шкіри, біоптат тканини, а також будь-який інший зразок тканини, який може бути одержаний методами, відомими фахівцям.

Альтернативно міченню зв'язувального білка, людський DLL4 може бути проаналізований в біологічних рідин за допомогою конкурентного імуноаналізу, що проводиться з використанням стандартних рекомбінантних людських (rh) DLL4, мічених детектованою речовиною, і описаного тут неміченого DLL4-зв'язувального білка. У цьому аналізі, біологічний зразок, мічені rhDLL4-стандарт і DLL4-зв'язувальний білок об'єднують і визначають кількість міченого rhDLL4-стандарту, зв'язаного з неміченим зв'язувальним білком. Кількість людського DLL4 в біологічному зразку зворотно пропорційна кількості міченого rhDLL4-стандарту, зв'язаного з DLL4-зв'язувальним білком. Аналогічним чином, людський DLL4 може бути також проаналізований в біологічних рідин за допомогою конкурентного імуноаналізу, що проводиться з використанням rhDLL4-стандартів, мічених детектованою речовиною, і описаного тут неміченого DLL4-зв'язувального білка.

Переважно, DLL4-зв'язувальні білки згідно з винаходом мають здатність нейтралізувати активність DLL4, зокрема активність hDLL4, *in vitro* і *in vivo*. Відповідно до цього, такі зв'язувальні білки згідно з винаходом можуть бути використані для інгібування активності DLL4, наприклад, в клітинній культурі, що містить DLL4, у людини або у інших ссавців, у яких експресуються DLL4, перехресно реагуючий зі зв'язувальним білком згідно з винаходом. У одному з варіантів даний винахід стосується способу інгібування активності DLL4, де вказаний спосіб включає контактування DLL4 з анти-DLL4 антитілом або його частиною згідно з винаходом з подальшим інгібуванням активності DLL4. Так, наприклад, в клітинній культурі, що містить або передбачувано містить DLL4, антитіло або його частина згідно з винаходом можуть бути додані в клітинне середовище з метою інгібування активності DLL4 в культурі.

У іншому варіанті даний винахід стосується способу зниження активності DLL4 у індивідуума, і переважно у індивідуума, страждаючого захворюванням або розладом, асоційованим з негативним впливом DLL4 або активності DLL4. Даний винахід стосується способів зниження рівня DLL4 або активності DLL4 у індивідуума, страждаючого вказаним захворюванням або розладом, де вказаний спосіб включає введення індивідууму DLL4-зв'язувального білка згідно з винаходом з метою зниження рівня DLL4 або активності DLL4 у індивідуума. Переважно, DLL4 являє собою людський DLL4, а вказаним індивідуумом є людина. Альтернативно, таким індивідуумом може бути ссавець, експресуючий DLL4, з яким може зв'язуватися DLL4-зв'язувальний білок згідно з винаходом. Крім того, таким індивідуумом може бути ссавець, якому був введений DLL4 (наприклад, шляхом прямого введення DLL4 або за допомогою експресії DLL4-трансгена). Антитіло або інший DLL4-зв'язувальний білок згідно з винаходом може бути введений людині в терапевтичних цілях. Крім того, DLL4-зв'язувальний білок згідно з винаходом може бути введений ссавцю, який не є людиною і експресує DLL4, з яким може зв'язуватися вказаний зв'язувальний білок, де вказаний білок вводять для лікування вказаної тварини або використовують для створення тварини з моделлю людського захворювання. У останньому випадку такі тварини-моделі можуть бути використані для оцінки терапевтичної ефективності антитіл і інших DLL4-зв'язувальних білків згідно з винаходом (наприклад, для тестування доз і проведення курсів лікування шляхом введення вказаного білка).

Використовуваний тут термін "розлад, асоційований з негативним впливом DLL4 і/або з активністю передачі Notch-сигналу", включає такі захворювання, як рак і інші розлади, при яких у індивідуумів, страждаючих вказаним розладом, спостерігається присутність DLL4 і/або активність передачі Notch-сигналу, які, як було встановлено або як підозрюється, відповідальні за патофізіологію вказаного розладу або є фактором, що підвищує тяжкість даного розладу. Відповідно до цього, розладом, асоційованим з негативним впливом DLL4 і/або з активністю передачі Notch-сигналу, є розлад, при якому зміна рівня DLL4 і/або активності передачі Notch-сигналу, як передбачається, сприяє ослабленню симптомів і/або прогресування вказаного розладу (наприклад, росту пухлини). Такі розлади можуть виявлятися такими ознаками, як посилення ангиогенезу у індивідуума, страждаючого вказаним розладом (наприклад, збільшення концентрації різних білків, відомих фахівцям, в сироватці, в плазмі, в синовіальній рідині і т. п. у індивідуума в процесі росту і утворення пухлини), де вказане посилення ангиогенезу може бути встановлене, наприклад, з використанням анти-DLL4 антитіла, описаного вище. Необмежувальними прикладами розладів, які можуть бути піддані лікуванню з використанням антитіл згідно з винаходом, є розлади, обговорювані в нижченаведеному розділі, що стосується фармацевтичних композицій антитіл згідно з винаходом.

II. Фармацевтичні композиції

Даний винахід також стосується фармацевтичних композицій, що містять DLL4-зв'язувальний білок згідно з винаходом і фармацевтично прийнятний носій. Фармацевтичні композиції, що містять DLL4-зв'язувальні білки згідно з винаходом, застосовуються в цілях, але не обмежуються ними, діагностики, детектування або моніторингу розладу, а також для попередження, лікування, усунення або зниження тяжкості розладу або одного або декількох його симптомів, і/або в дослідженнях. У конкретному варіанті винаходу композиція містить один або декілька DLL4-зв'язувальних білків згідно з винаходом. У іншому варіанті винаходу фармацевтична композиція містить один або декілька зв'язувальних білків згідно з винаходом і один або декілька профілактичних або терапевтичних засобів, які не є зв'язувальними білками згідно з винаходом і використовуються для лікування розладу, асоційованого з негативним впливом DLL4 і/або активності DLL4. Переважно, профілактичні або терапевтичні засоби, як відомо, можуть бути використані, вже були використані або використовуються на даний час для попередження, лікування, усунення або зниження тяжкості розладу, наприклад раку або пухлини, або одного або декількох їх симптомів. Відповідно до цих варіантів вказана композиція може також містити носій, розріджувач або наповнювач.

Зв'язувальні білки згідно з винаходом можуть бути включені в фармацевтичні композиції, придатні для введення індивідууму. Звичайно фармацевтична композиція містить DLL4-зв'язувальний білок (або його DLL4-зв'язувальну частину) згідно з винаходом і фармацевтично прийнятний носій. Використовуваний тут термін "фармацевтично прийнятний носій" включає будь-які і всі розчинники, дисперсійні середовища, матеріал для покриттів, антибактеріальні і протигрибкові засоби, ізотонічні агенти і агенти, що уповільнюють абсорбцію, і т. п., які є фізіологічно сумісними. Прикладами фармацевтично прийнятних носіїв є один або декілька компонентів, таких як вода, фізіологічний розчин, забуферений фосфатом фізіологічний розчин, декстроза, гліцерин, етанол і т. п., а також їх комбінації. У багатьох випадках у вказану композицію можуть бути включені ізотонічні агенти, наприклад цукри, багатоатомні спирти, такі як маніт і сорбіт, або хлорид натрію. Фармацевтично прийнятні носії можуть також містити невеликі кількості допоміжних речовин, таких як змочувальні або емульгуючі агенти, консерванти або буфери, які дозволяють збільшувати термін зберігання або ефективність антитіла або його частини.

Різні системи доставки відомі фахівцям і можуть бути використані для введення одного або декількох DLL4-зв'язувальних білків згідно з винаходом або комбінацій одного або декількох DLL4-зв'язувальних білків згідно з винаходом і профілактичного або терапевтичного засобу, придатного для попередження, лікування, усунення або зниження тяжкості розладу або одного або декількох його симптомів, наприклад для пригнічення ангіогенезу пухлини, де вказане введення здійснюють шляхом інкапсулювання в ліпосоми, в мікрочастинки, в мікрокапсули, в рекомбінантні клітини, здатні експресувати DLL4-зв'язувальний білок; шляхом рецептор-опосередкованого ендозитозу (див., наприклад, Wu & Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)) і шляхом конструювання нуклеїнової кислоти як частини ретровірусного або іншого вектора, і т. п. Методи введення профілактичного або терапевтичного засобу згідно з винаходом включають, але не обмежуються ними, парентеральне введення (наприклад, інтрадермальне, внутрішньом'язове, внутрішньоочеревинне, внутрішньовенне і підшкірне), епідуральне введення, введення в пухлину і введення в слизову (наприклад, інтраназальне і пероральне введення). Крім того, введення в легені може бути здійснене, наприклад, з використанням інгалятора або аерозольного розпилювача і складу, який містить агент, що утворює аерозоль. Див., наприклад, патенти США №№ 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 і 4880078; і публікації заявок РСТ WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 і WO 99/66903, які у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання. У одному з варіантів винаходу DLL4-зв'язувальний білок згідно з винаходом, засоби для комбінованої терапії або композицію згідно з винаходом вводять із застосуванням технології доставки лікарського засобу в легені Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts, US). У конкретному варіанті винаходу профілактичні або терапевтичні засоби згідно з винаходом вводять внутрішньом'язово, внутрішньовенно, всередину пухлини, перорально, інтраназально, в легені або підшкірно. Профілактичні або терапевтичні засоби можуть бути введені будь-яким стандартним способом, наприклад шляхом вливання або ін'єкції ударної дози, шляхом абсорбції через епітеліальну або шкірно-слизову вистілку (наприклад, через слизову ротової порожнини, слизову прямої кишки і тонкої кишки і т. п.), і можуть бути також введені в комбінації з іншими біологічно активними засобами. Введення може бути системним або місцевим.

У конкретному варіанті винаходу може виявитися бажаним місцеве введення профілактичних або терапевтичних засобів згідно з винаходом в область, на яку направлено лікування; і це може бути досягнуте, наприклад, такими способами, але не обмежуються ними, як місцева інфузія, ін'єкція або введення імплантата, де вказаний імплантат складається з пористого або непористого матеріалу, включаючи мембрани і матриці, такі як сіаластичні мембрани, полімери, волокнистий матрикс (наприклад, Tissuel®) або колагеновий матрикс. У одному з варіантів винаходу ефективну кількість одного або декількох DLL4-зв'язувальних білків-антагоністів згідно з винаходом вводять пацієнту місцево в уражену область для попередження, лікування, усунення і/або зниження тяжкості розладу

або його симптомів. У іншому варіанті винаходу ефективну кількість одного або декількох DLL4-зв'язувальних білків згідно з винаходом вводять місцево в уражену область в комбінації з ефективною кількістю одного або декількох терапевтичних засобів (наприклад, одного або декількох профілактичних або терапевтичних засобів), які не є зв'язувальним білком згідно з винаходом і використовуються для попередження, лікування, усунення і/або зниження тяжкості розладу або одного або декількох його симптомів.

У іншому варіанті винаходу профілактичний або терапевтичний засіб може бути доставлений у вигляді системи контрольованого вивільнення або системи уповільненого вивільнення. У одному з варіантів винаходу для досягнення контрольованого або уповільненого вивільнення може бути використаний насос (див. 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 іншому варіанті винаходу для забезпечення контрольованого або уповільненого вивільнення терапевтичних засобів згідно з винаходом можуть бути використані полімерні матеріали (див. наприклад, 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); див. також 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); патенти США №№ 5679377, 5916597, 5912015, 5989463 і 5128326; і публікації заявок РСТ №№ WO 99/15154 і WO 99/20253). Прикладами полімерів, використовуваних в складах уповільненого вивільнення, є, але не обмежуються ними, полі(2-гідроксietилметакрилат), поліметилметакрилат, поліакрилова кислота, співполімер етилену і вінілацетату, поліметакрилова кислота, полігліколіди (ПЛГ), поліангідриди, полі-N-вінілпіролідон, полівініловий спирт, поліакриламід, поліетиленгліколь, полілактиди (PLA), співполімери лактиду і гліколіду (PLGA) і поліортоєфіри. У одному з варіантів винаходу полімер, використовуваний в складі уповільненого вивільнення, є інертним, не містить вилуговуваних домішок, є стабільним при зберіганні, стерильним і біологічно розкладаним. У іншому варіанті винаходу система контрольованого або уповільненого вивільнення може бути введена поблизу від профілактичної або терапевтичної мішені, для чого буде потрібна лише частина системної дози (див., наприклад, Goodson, Medical Applications of Controlled Release (1984), pages 115-138).

Системи контрольованого вивільнення обговорюються в роботі Langer (1990, Science 249: 1527-1533). Для одержання складів уповільненого вивільнення, що містять один або декілька терапевтичних засобів згідно з винаходом, може бути застосований будь-який метод, відомий фахівцям в даній галузі. Див., наприклад, патент США № 4526938, публікації заявок РСТ WO 91/05548 і 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 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), і Lam et al., "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery" Proceed. Intl. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.: 24: 759-760 (1997), які у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання.

У конкретному варіанті винаходу, якщо композицією згідно з винаходом є нуклеїнова кислота, що кодує профілактичний або терапевтичний засіб, то така нуклеїнова кислота може бути введена *in vivo* для стимуляції експресії кодованих нею профілактичних або терапевтичних засобів, де вказану нуклеїнову кислоту конструюють як частину відповідного вектора, експресуючого нуклеїнову кислоту, і вводять таким чином, щоб вона проникала всередину клітини, наприклад, за допомогою ретровірусного вектора (див. патент США № 4980286), за допомогою прямої ін'єкції або за допомогою бомбардування мікрочастинками (наприклад, з використанням "дробовика" для вистрілювання генів; Biolistic, Dupont) або шляхом покриття ліпідами, рецепторами клітинної поверхні або трансфікуючими агентами; або шляхом її включення у формі, зв'язаній з гомеобоксоподібним пептидом, який, як відомо, вбудовується в ядро (див., наприклад, Joliot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868 (1991)). Альтернативно, нуклеїнова кислота може бути введена всередину клітини і вбудована в ДНК клітини-хазяїна для експресії за допомогою гомологічної рекомбінації.

Фармацевтичну композицію згідно з винаходом одержують у формі, сумісній з передбачуваним способом введення. Прикладами способів введення є, але не обмежуються ними, парентеральне введення (наприклад, внутрішньовенне введення), інтрадермальне введення, підшкірне введення, пероральне введення, інтраназальне введення (наприклад, шляхом інгаляції), трансдермальне введення (наприклад, місцеве введення), введення через слизову і ректальне введення. У конкретному варіанті винаходу вказану композицію приготують рутинними методами у вигляді фармацевтичної композиції, адаптованої для внутрішньовенного, підшкірного, внутрішньом'язового, перорального, інтраназального або місцевого введення людині. Звичайно композиції для внутрішньовенного введення являють собою розчини в стерильному ізотонічному водному буфері. За

необхідності, така композиція може також включати солюбілізуючий агент і місцевий анестетик, такий як лігнокаїн, для полегшення болю на ділянці ін'єкції.

Якщо композиції згідно з винаходом вводять місцево, то вони можуть бути приготовані у вигляді мазі, крему, черезшкірного пластиру, лосьйону, гелю, шампуню, спрею, аерозолю, розчину, емульсії або іншої форми, добре відомої фахівцям. Див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms. 19th ed. (Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1995). Для цього звичайно використовуються лікарські форми для місцевого введення, що не є спреєм, а також в'язкі або напівтверді або тверді форми, що містять носій або один або декілька наповнювачів, які сумісні з місцевим введенням і мають динамічну в'язкість, яка перевищує динамічну в'язкість води. Придатними складами є, але не обмежуються ними, розчини, суспензії, емульсії, креми, рідкі мазі, порошки, пастоподібні мазі, тверді мазі і т. п., які за необхідності можуть бути стерилізовані або змішані з допоміжними агентами (наприклад, з консервантами, стабілізаторами, змочувальними агентами, буферами або солями) для зміни різних властивостей, таких як, наприклад, осмотичний тиск. Іншими придатними лікарськими формами для місцевого введення є розпилювані аерозольні склади, в яких активний інгредієнт, присутній в комбінації з твердим або рідким інертним носієм, упакований у вигляді суміші з леткими речовинами під тиском (наприклад, з газоподібним пропелентом, таким як FREON®) або поміщений в бутель під тиском. У фармацевтичні композиції і в лікарські форми можуть бути додані, якщо це необхідно, зволожувачі або змочувальні засоби. Приклади таких додаткових інгредієнтів добре відомі фахівцям.

Якщо спосіб згідно з винаходом включає інтраназальне введення композиції, то така композиція може бути приготована в формі аерозолю, спрею, парів, що утворюють туман, або в формі крапель. Зокрема, профілактичні або терапевтичні засоби, використовувані в даному винаході, можуть бути легко доставлені в формі аерозольного спрею з упаковок під тиском або аерозольного інгалятора з використанням прийнятного пропеленту (наприклад, дихлордифторметану, трихлорфторметану, дихлортетрафторетану, діоксиду вуглецю або іншого придатного газу). У випадку використання аерозолю під тиском, уніфікована доза лікарської форми може бути визначена за допомогою дозуючого клапана. Можуть бути приготовані капсули і картриджі (що складаються, наприклад, з желатину) для їх використання в інгаляторі або в інсуфляторі, де вказані капсули і картриджі містять порошкоподібну суміш сполуки і придатної порошкоподібної основи, такої як лактоза або крохмаль.

Якщо спосіб згідно з винаходом включає пероральне введення, то композиції для такого перорального введення можуть бути приготовані в формі таблеток, капсул, саше, гелевих капсул, розчинів, суспензій і т. п. Таблетки або капсули можуть бути одержані стандартними методами з використанням фармацевтично прийнятних наповнювачів, таких як зв'язувальні агенти (наприклад, кукурудзяний крохмаль в попередній стадії желатинізації, полівінілпіролідон або гідроксипропілметилцелюлоза); наповнювачі (наприклад, лактоза, мікрокристалічна целюлоза або біфосфат кальцію); замаслювачі (наприклад, стеарат магнію, тальк або двоокис кремнію); дезінтегратори (наприклад, кукурудзяний крохмаль або натрійвмісний гліколят крохмалю) або змочувальні агенти (наприклад, лаурилсульфат натрію). На таблетки можуть бути нанесені покриття добре відомими методами. Рідкі склади для перорального введення можуть бути приготовані в таких формах, але не обмежуються ними, як розчини, сиропи або суспензії, або вони можуть бути одержані у вигляді сухого продукту, який, перед його застосуванням, може бути розведений водою або іншим придатним носієм. Такі рідкі склади можуть бути одержані стандартними методами з використанням фармацевтично прийнятних добавок, таких як суспендуючі агенти (наприклад, сорбітоловий сироп, похідні целюлози або гідрогенізовані харчові жири); емульгуючі агенти (наприклад, лецитин або аравійська камедь); безводні носії (наприклад, мигдалева олія, ефіри олій, етиловий спирт або фракціоновані рослинні олії) і консерванти (наприклад, метил- або пропіл-п-гідроксибензоати або сорбінова кислота). Ці склади можуть також містити забуферювальні солі, ароматизатори, барвники і підсолоджувачі, якщо це необхідно. Склади для перорального введення можуть бути відповідним чином приготовані для досягнення контрольованого вивільнення або уповільненого вивільнення профілактичного(их) або терапевтичного(их) засобу (засобів).

Спосіб згідно з винаходом може включати введення композиції, приготованої в комбінації з агентом, що утворює аерозоль, в легені, наприклад, з використанням інгалятора або аерозольного розпилювача. Див., наприклад, патенти США №№ 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 і 4880078; і публікації заявок PCT №№ WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 і WO 99/66903, які у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання. У конкретному варіанті винаходу, антитіло згідно з винаходом, засіб для комбінованої терапії і/або композицію згідно з винаходом вводять із застосуванням технології доставки лікарського засобу в легені Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts, US).

Спосіб згідно з винаходом може включати введення композиції, приготованої для парентерального введення шляхом ін'єкції (наприклад, шляхом ін'єкції ударної дози або безперервного вливання). Композиції для ін'єкції можуть бути приготовані в уніфікованій лікарській формі (наприклад, в ампулах або в контейнерах для багаторазового введення доз) з додаванням консерванту. Композиції можуть

бути одержані в таких формах, як суспензії, розчини або емульсії в масляних або водних носіях, і можуть містити агенти для приготування композицій, такі як суспендуючі, стабілізуючі і/або диспергуючі агенти. Альтернативно, активний інгредієнт може бути приготований в порошкоподібній формі, яка, перед її застосуванням, може бути розведена придатним носієм (наприклад, стерильною апірогенною водою).

Спосіб згідно з винаходом може також включати введення композицій, приготованих у вигляді депо-складів. Такі склади уповільненої дії можуть бути введені шляхом імплантації (наприклад, підшкірно або внутрішньом'язово) або шляхом внутрішньом'язової ін'єкції. Так, наприклад, композиції можуть бути приготовані з використанням придатних полімерних або гідрофобних матеріалів (наприклад, у вигляді емульсії у відповідному маслі) або іонообмінних смол, або у вигляді слабкорозчинних похідних (наприклад, у вигляді слабкорозчинної солі).

Способи згідно з винаходом включають введення композицій, приготованих у вигляді нейтральної або сольової форми. Фармацевтично прийнятними солями є солі, утворені аніонами, такими як аніони хлористоводневої, фосфорної, оцтової, щавлевої, винної кислот і т. п., і солі, утворені катіонами, такими як катіони натрію, калію, амонію, кальцію, гідроксидів заліза(3), ізопропіламіну, триетиламіну, 2-етиламіноетанолу, гістидину, прокаїну і т. п.

Звичайно інгредієнти композицій постачаються або окремо, або в суміші в уніфікованій лікарській формі, наприклад у вигляді сухого ліофілізованого порошку або безводного концентрату в герметично запаяному контейнері, такому як ампула або саше, з вказаною кількістю активного агента. Якщо способом введення є вливання, то композиція може бути розфасована по бутлях для вливання розчину, що містять стерильну воду фармацевтичної якості або фізіологічний розчин. Якщо способом введення є ін'єкція, то ампулу зі стерильною водою для ін'єкцій або з фізіологічним розчином приготують так, щоб інгредієнти могли бути змішані перед введенням.

Зокрема, даний винахід також стосується одного або декількох профілактичних або терапевтичних засобів або фармацевтичних композицій згідно з винаходом, упакованих в герметично запаяний контейнер, такий як ампула або саше, з вказаною кількістю активного агента. У одному з варіантів винаходу один або декілька профілактичних або терапевтичних засобів або фармацевтичні композиції згідно з винаходом постачаються у вигляді сухого ліофілізованого порошку або безводного концентрату в герметично запаяному контейнері і можуть бути розведені (наприклад, водою або фізіологічним розчином) до відповідної концентрації, необхідної для введення індивідууму. Переважно, один або декілька профілактичних або терапевтичних засобів або фармацевтичні композиції згідно з винаходом постачаються у вигляді сухого стерильного ліофілізованого порошку в герметично запаяному контейнері в уніфікованій дозі, що складає щонайменше 5 мг, а більш переважно щонайменше 10 мг, щонайменше 15 мг, щонайменше 25 мг, щонайменше 35 мг, щонайменше 45 мг, щонайменше 50 мг, щонайменше 75 мг або щонайменше 100 мг. Ліофілізовані профілактичні або терапевтичні засоби або фармацевтичні композиції згідно з винаходом повинні зберігатися при 2-8 °C в контейнері, в якому вони були одержані, і ці профілактичні або терапевтичні засоби або фармацевтичні композиції згідно з винаходом повинні бути введені через 1 тиждень, а переважно через 5 днів, через 72 години, через 48 годин, через 24 години, через 12 годин, через 6 годин, через 5 годин, через 3 години або через 1 годину після розведення. У альтернативному варіанті винаходу один або декілька профілактичних або терапевтичних засобів або фармацевтичні композиції згідно з винаходом постачаються в рідкій формі в герметично запаяному контейнері з вказаною кількістю і концентрацією агента. Переважно, композиція, що вводиться в рідкій формі, постачається в герметично запаяному контейнері в кількості, що складає щонайменше 0,25 мг/мл, а більш переважно щонайменше 0,5 мг/мл, щонайменше 1 мг/мл, щонайменше 2,5 мг/мл, щонайменше 5 мг/мл, щонайменше 8 мг/мл, щонайменше 10 мг/мл, щонайменше 15 мг/кг, щонайменше 25 мг/мл, щонайменше 50 мг/мл, щонайменше 75 мг/мл або щонайменше 100 мг/мл. Така рідка форма повинна зберігатися при 2-8 °C в контейнері, в якому вона була одержана.

Зв'язувальні білки згідно з винаходом можуть бути включені в фармацевтичну композицію, придатну для парентерального введення. Переважно, зв'язувальний білок одержують у вигляді розчину для ін'єкцій, що містить 0,1-250 мг/мл антитіла. Розчин для ін'єкцій може складатися з рідкої або ліофілізованої лікарської форми і знаходитися в посудині з кремнію або янтарної смоли, в ампулі або в попередньо заповненому шприці. Буфер може являти собою 1-50 mM L-гістидин (оптимально 5-10 mM), при pH 5,0-7,0 (оптимально pH 6,0). Іншими придатними буферами є, але не обмежуються ними, сукцинат натрію, цитрат натрію, фосфат натрію або фосфат калію. Хлорид натрію може бути використаний для зниження токсичності розчину при концентрації 0-300 mM (для рідкої лікарської форми оптимальною є концентрація 150 mM). У ліофілізовану лікарську форму можуть бути включені кріозахисні агенти, головним чином 0-10% сахароза (оптимально 0,5-1,0%). Іншими придатними кріозахисними агентами є трегалоза і лактоза. У ліофілізовану лікарську форму можуть бути включені агенти, що надають об'єм, головним чином 1-10% маніт (оптимально 2-4%). У рідких і ліофілізованих лікарських формах можуть використовуватися стабілізатори, головним чином 1-50 mM L-метіоніну (оптимально 5-10 mM). Іншими придатними агентами, що надають об'єм, є гліцин і аргінін, які можуть

бути включені у вигляді 0-0,05% полісорбату-80 (оптимально 0,005-0,01%). Додатковими поверхнево-активними речовинами є, але не обмежуються ними, полісорбат-20 і поверхнево-активні речовини BRIJ.

Композиції згідно з винаходом можуть мати різні форми. Такими формами є, наприклад, рідкі, напівтверді і тверді лікарські форми, такі як рідкі розчини (наприклад, розчини для ін'єкцій і інфузій), дисперсії або суспензії, таблетки, драже, порошки, ліпосоми і супозиторії. Вибір таких форм залежить від передбачуваного способу введення і терапевтичного застосування. Типовими композиціями є композиції у формі розчинів для ін'єкцій або інфузій, такі як композиції, аналогічні композиціям, використовуваним для пасивної імунізації людини іншими антитілами. Вибраним способом введення є парентеральне введення (наприклад, внутрішньовенне, підшкірне, внутрішньоочеревинне, внутрішньом'язове введення). У переважному варіанті винаходу описаний тут DLL4-зв'язувальний білок вводять шляхом внутрішньовенного вливання або внутрішньовенної ін'єкції. У іншому переважному варіанті винаходу DLL4-зв'язувальний білок вводять шляхом внутрішньом'язової або підшкірної ін'єкції.

Терапевтичні композиції звичайно повинні бути стерильними і стабільними в умовах їх одержання і зберігання. Така композиція може бути приготована у вигляді розчину, мікроемульсії, дисперсії, ліпосоми або іншої впорядкованої структури, придатної для введення лікарського засобу у високій концентрації. Стерильні розчини для ін'єкцій можуть бути одержані шляхом введення активної сполуки (тобто антитіла або його частини) в потрібній кількості у відповідному розчиннику разом з одним з перерахованих тут інгредієнтів або з їх комбінаціями, якщо це необхідно, з подальшою стерилізацією шляхом фільтрації. Взагалі кажучи, дисперсії одержують шляхом введення активної сполуки в стерильний носій, що містить основне дисперсійне середовище і інші необхідні інгредієнти з числа інгредієнтів, перерахованих в даній заявці. У випадку використання стерильних ліофілізованих порошків для одержання стерильних розчинів для ін'єкцій, такі порошки переважно приготують із попередньо стерильно відфільтрованого розчину шляхом його вакуумного сушіння і сушіння розпиленням з одержанням порошку, що містить активний інгредієнт плюс будь-який додатковий потрібний інгредієнт. Відповідна текучість розчину може підтримуватися, наприклад, з використанням покриття, такого як лецитин, шляхом збереження необхідного розміру частинок у випадку дисперсії і з використанням поверхнево-активних речовин. Уповільнена абсорбція композицій для ін'єкцій може досягатися шляхом включення в дану композицію агента, що уповільнює абсорбцію, наприклад моностеаратних солей і желатину.

DLL4-зв'язувальні білки згідно з винаходом можуть бути введені різними методами, відомими фахівцям, хоч, в одному з варіантів винаходу, для багатьох терапевтичних застосувань, переважним шляхом/способом введення є підшкірна ін'єкція, внутрішньовенна ін'єкція або інфузія. Потрібно зазначити, що шлях і/або спосіб введення варіюють залежно від бажаних результатів. У деяких варіантах винаходу активна сполука може бути одержана з використанням носія, який буде захищати дану сполуку від швидкого вивільнення, наприклад, у вигляді складу з контрольованим вивільненням, включаючи імпланти, черезшкірні пластири і мікроінкапсульовані системи доставки. Можуть бути використані біологічно розкладані, біологічно сумісні полімери, такі як етиленвінілацетат, поліангідриди, полігліколева кислота, колаген, поліортоефіри і полімолочна кислота. Багато які методи одержання таких складів запатентовані або, як правило, відомі фахівцям в даній галузі техніки. Див., наприклад, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed. (Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

У деяких варіантах винаходу зв'язувальний білок згідно з винаходом може бути введений перорально, наприклад, разом з інертним розріджувачем або з легко засвоюваним харчовим носієм. Сполука (і інші інгредієнти, якщо це необхідно) може бути поміщена в жорсткі або м'які желатинові капсули, спресована в таблетки або включена безпосередньо в їжу індивідуума. Для перорального терапевтичного введення сполуки можуть бути введені разом з наповнювачами і використані в формі таблеток для проковтування, защічних таблеток, пастилок, капсул, еліксирів, суспензій, сиропів, облаток і т. п. Для введення сполуки згідно з винаходом непарентеральними методами може виявитися необхідним нанесення на сполуку покриття з матеріалу, що попереджає її інактивацію, або спільне введення сполуки з цим матеріалом.

У композиції можуть бути також включені допоміжні активні сполуки. У деяких варіантах винаходу зв'язувальний білок згідно з винаходом приготують і/або вводять разом з одним або декількома іншими терапевтичними засобами, які можуть бути використані для лікування розладів, асоційованих з негативним впливом активності DLL4. Так, наприклад, анти-huDLL4 антитіло або його частина згідно з винаходом можуть бути приготовані і/або введені разом з одним або декількома додатковими антитілами, які зв'язуються з іншими мішенями (наприклад, з антитілами, які зв'язуються з іншими цитокінами або з молекулами клітинної поверхні). Крім того, один або декілька зв'язувальних білків згідно з винаходом можуть бути використані в комбінації з двома або більше вищезазначеними терапевтичними засобами. У такій комбінованій терапії можуть застосовуватися переважно більш низькі дози терапевтичних засобів, що вводяться, що дозволяє уникнути можливої токсичності або

ускладнень, асоційованих з різними монотерапіями.

У деяких варіантах винаходу DLL4-зв'язувальний білок згідно з винаходом приєднують до відомого носія, що збільшує час напівжиття цього білка. Такими носіями є, але не обмежуються ними, Фс-домен, поліетиленгліколь і декстран. Такі носії описані, наприклад, в патенті США № 6660843 В1 і в опублікованій заявці РСТ WO 99/25044, які вводяться в даний опис за допомогою посилання.

У конкретному варіанті винаходу методами генотерапії, що проводиться з метою лікування, попередження, усунення або зниження тяжкості розладу або одного або декількох його симптомів, є введення нуклеотидних послідовностей нуклеїнової кислоти, що кодують зв'язувальний білок згідно з винаходом або інший профілактичний або терапевтичний засіб згідно з винаходом. Генотерапія означає терапію, здійснювану шляхом введення індивідууму нуклеїнової кислоти, що експресована або експресується. У цьому варіанті винаходу нуклеїнові кислоти продукують кодовані ними зв'язувальний білок або профілактичний або терапевтичний засіб згідно з винаходом, які опосередковують профілактичний або терапевтичний ефект.

У даному винаході може бути застосований будь-який з методів генотерапії, відомих фахівцям. Загальний огляд цих методів генотерапії можна знайти в публікаціях 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); і Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem., 62: 191-217 (1993); Robinson C. Trends Biotechnol, 11(5): 155 (1993). Методи, добре відомі фахівцям в галузі техніки рекомбінантних ДНК, можна знайти в керівництві 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). Докладний опис різних методів генотерапії наводиться в публікації заявки на патент США № 20050042664 А1, яка вводиться в даний опис за допомогою посилання.

У іншому аспекті даний винахід стосується способу терапії (наприклад, лікування, інгібування, ослаблення симптомів, уповільнення або запобігання розвитку або повторній появі або рецидиву) або попередження розвитку DLL4-асоційованої пухлини у індивідуума. Вказаний спосіб включає введення індивідууму DLL4-зв'язувального білка, наприклад анти-DLL4 антитіла або його фрагмента, описаних в даній заявці, в кількості, достатній для лікування або попередження розвитку DLL4-асоційованої пухлини або DLL4-асоційованого ракового захворювання. Антагоніст DLL4, тобто анти-DLL4 антитіло або його фрагмент, може бути введений індивідууму окремо або в комбінації з іншими терапевтичними засобами, описаними в даній заявці.

DLL4 грає важливу роль в розвитку патології, асоційованої з рядом захворювань, включаючи імунні і запальні компоненти, зокрема ангиогенез при раковому захворюванні і пухлині. Прикладами DLL4-асоційованих розладів є, але не обмежуються ними, розлади, які негативно впливають на нижченаведені біологічні процеси: на функцію і розвиток нервової системи; на стабілізацію артеріальних ендотеліальних процесів і ангиогенез; на регуляцію основних клітинних взаємодій між ендокардом і міокардом під час зародження клапана і розвитку і диференціації шлуночків; на гомеостаз серцевого клапана, а також на процеси, що викликають інші розлади у людини, включаючи розлади серцево-судинної системи; тимчасове диференціювання клітинних ліній ендокринного або екзокринного відділу підшлункової залози; на вибір клітиною одного з двох шляхів лінії диференціювання, а саме вибір між секреторною і абсорбційною лініями диференціювання в кишечнику; на збільшення компартменту гемопоетичних стовбурових клітин в процесі розвитку кістки і участь в комітуванні клітин в остеобластну лінію диференціювання, наприклад в процесі розвитку остеопорозу; на регуляцію вибору клітиною шляху диференціювання в молочних залозах на деяких окремих стадіях розвитку; і на певні неядерні механізми, такі як регуляція рівня актину в цитоскелеті за допомогою тирозинкінази Ab1. Більш конкретно, DLL4-асоційованими розладами є, але не обмежуються ними, рак, Т-ГЛЛ (Т-клітинний гострий лімфобластний лейкоз), CADASIL (церебральна аутосомно-домінантна артеріопатія, асоційована з інфарктами в підкорковому шарі і лейкоенцефалопатією), РС (розсіяний склероз), тетралогія Фалло і синдром Алажілья. Антитіла і їх антигензв'язувальні частини, описані в даній заявці, переважно використовувати для лікування раку і пухлин.

Зв'язувальні білки згідно з винаходом можуть бути використані окремо або в комбінації один з одним, тобто більше ніж один описаний тут DLL4-зв'язувальний білок може бути використаний для лікування раку, пухлини або іншого розладу, при яких, на здоров'я індивідуума, найбільш сприятливий ефект надають зв'язування з DLL4, інгібування DLL4 і/або нейтралізація DLL4, або такий ефект може бути досягнутий іншими способами.

Потрібно зазначити, що DLL4-зв'язувальні білки згідно з винаходом можуть бути використані окремо або в комбінації з додатковим агентом, наприклад з терапевтичним засобом, де вказаний додатковий агент може бути вибраний самим фахівцем залежно від мети введення. Так, наприклад, додатковим агентом може бути терапевтичний засіб, який, як відомо, може бути використаний для лікування раку, пухлини або захворювання або стану, при якому зв'язування з DLL4 або інгібування DLL4 розглядається як бажаний або переважний фактор для лікування раку, пухлини або іншого

захворювання або стану. Додатковим агентом може бути також агент, який надає терапевтичній композиції додаткової ефективності, наприклад агент, який поліпшує в'язкість композиції.

Потрібно також зазначити, що комбінації згідно з винаходом являють собою комбінації, які можуть бути використані з метою даного винаходу. Засоби, описані нижче, наводяться лише для ілюстрації і не обмежують обсягу винаходу. Комбінаціями, які є частиною даного винаходу, можуть бути антитіла згідно з винаходом, що вводяться в поєднанні щонайменше з одним додатковим агентом, вибраним з нижченаведеного списку. Комбінація може також включати більше ніж один додатковий агент, наприклад два або три додаткових агенти, якщо такою комбінацією є одержана композиція, яка може здійснювати потрібні функції.

Переважними комбінаціями є нестероїдні прозапальні засоби, також звані НСПЗЗ, які включають лікарські засоби, подібні до ібупрофену. Іншими переважними комбінаціями є кортикостероїди, включаючи преднізолон; при цьому добре відомі побічні ефекти використовуваних стероїдів можуть бути знижені або навіть усунені шляхом зменшення дози стероїдів, використовуваних для лікування пацієнтів в комбінації з анти-DLL4 антитілами згідно з винаходом. Необмежувальними прикладами терапевтичних засобів для лікування ревматоїдного артриту, з якими можуть бути об'єднані антитіло або його частина згідно з винаходом, є інгібуючі цитокін прозапальні засоби (ЦІПЗ); антитіла або антагоністи проти інших людських цитокінів або факторів росту, наприклад 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, інтерферонів, EMAP-II, GM-CSF, FGF і PDGF. Антитіла згідно з винаходом або їх антигензв'язувальні частини можуть бути об'єднані з антитілами проти молекул клітинної поверхні, таких як CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA або їх ліганди включаючи CD154 (gp39 або CD40L).

Переважні комбінації терапевтичних засобів можуть впливати на різні ділянки шляхів передачі проонкогенного або проангіогенного сигналу. Переважними прикладами терапевтичних засобів, які можуть бути використані в способах і композиціях згідно з винаходом, є протипухлинні засоби, засоби для променевої терапії і хіміотерапевтичні засоби, такі як ДНК-алкілувальні агенти, цисплатин, карбоплатин, антитубулінові агенти, паклітаксел, доцетаксел, таксол, доксорубіцин, гемцитабін, гемзар, антрацикліни, адриаміцин, інгібітори топоізомерази I, інгібітори топоізомерази II, 5-фторурацил (5-FU), лейковорин, іринотекан, інгібітори тирозинкіназних рецепторів (наприклад, ерлотиніб, gefitinib), інгібітори COX-2 (наприклад, целекоксиб) і інгібітори кінази.

DLL4-зв'язувальні білки згідно з винаходом можуть бути також об'єднані з такими агентами, як метотрексат, 6-MP, азатіоприн, сульфасалазин, месалазин, олсалазин, хлорохінін/гідроксихлорохінін, пеніциламін, ауротіомалат (що вводиться внутрішньом'язово і перорально), азатіоприн, колхіцин, кортикостероїди (ін'єктовані перорально, шляхом інгаляції і місцево), агоністи адренорецептора бета-2 (сальбутамол, тербуталін, сальметерал), ксантини (теофілін, амінофілін), кромоглікат, недокроміл, кетотифен, іпратропій і окситропій, циклоспорин, FK506, рапаміцин, мікофеноляту мофетил, лефлуномід, НСПЗЗ, наприклад ібупрофен, кортикостероїди, такі як преднізолон, інгібітори фосфодіестерази, агоністи аденозину, антитромботичні засоби, інгібітори комплементу, адренергічні засоби, агенти, що блокують передачу сигналу прозапальними цитокінами, такими як IL-1 (наприклад, інгібітори кіназ IRAK, NIK, IKK, p38 або MAP), інгібітори IL-1 β - і TNF α -конвертуючих ферментів (TACE), інгібітори Т-клітинних конвертуючих ферментів, інгібітори передачі TNF α -сигналу, такі як інгібітори кінази, інгібітори металопротеїнази, сульфасалазин, азатіоприн, 6-меркаптопурини, інгібітори ангіотензинконвертуючого ферменту, розчинні рецептори цитокінів і їх похідні (наприклад, розчинні рецептори TNF p55 або p75 і похідні p75TNFRlgG (Enbrel™ і p55TNFRlgG (Ленерцепт)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), прозапальні цитокіни (наприклад, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 і TGF β), целекоксиб, фолієва кислота, сульфат гідроксихлорохіну, рофекоксиб, етанерцепт, інфліксимаб, напроксен, вальдекоксиб, сульфасалазин, метилпреднізолон, мелоксикам, ацетат метилпреднізолону, тіомалат золота-натрію, аспірин, ацетонід триамцінолону, напсилат пропоксифену/APAP, фолат, набуметон, диклофенак, піроксикам, етодолак, диклофенак натрію, оксaproзин, оксикодон-HCl, бітаратр гідроксидону/APAP, диклофенак натрію/мізопростол, фентаніл, анакінра, людський рекомбінантний трамадол-HCl, салсалат, суліндак, ціанокобаламін/фа/піридоксин, ацетамінофен, алендронат натрію, преднізолон, сульфат морфіну, гідрохлорид лідокаїну, індометацин, сульфат глюкозаміну/хондроїтин, амітриптилін-HCl, сульфадіазин, оксикодон-HCl/ацетамінофен, олопатадин-HCl, мізопростол, напроксен натрію, омепразол, циклофосфамід, ритуксимаб, IL-1, TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, анти-IL-18 антитіло, анти-IL15 антитіло, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, рофлумеласт, IC-485, CDC-801 і мезопрам. Переважні комбінації включають метотрексат або лефлуномід, а у випадку помірного або важкого ревматоїдного артриту - циклоспорин.

Необмежувальними прикладами терапевтичних засобів для лікування раку, з якими може бути об'єднаний DLL4-зв'язувальний білок згідно з винаходом, є нижченаведені засоби: будезонід; епідермальний фактор росту; кортикостероїди; циклоспорин, сульфасалазин; аміносаліцилати; 6-меркаптопурин; азатіоприн; метронідазол; інгібітори ліпоксигенази; месаламін; олсалазин; балсалазид; антиоксиданти; інгібітори тромбосану; антагоністи рецептора IL-1; моноклональні анти-IL-1 β антитіла; моноклональні анти-IL-6 антитіла; фактори росту; інгібітори еластази; сполуки

піридинілімідазолу; антитіла або антагоністи, направлені проти інших людських цитокінів або факторів росту, наприклад 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 і PDGF. Антитіла згідно з винаходом або їх антигензв'язувальні частини можуть бути об'єднані з антитілами проти молекул клітинної поверхні, таких як CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90, або їх лігандів. Антитіла згідно з винаходом або їх антигензв'язувальні частини можуть бути об'єднані з такими засобами, як метотрексат, циклоспорин, FK506, рапаміцин, мікофеноляту мофетил, лефлуномід, НСПЗЗ, наприклад ібупрофен, кортикостероїди, такі як преднізолон, інгібітори фосфодіестерази, агоністи аденозину, антитромботичні засоби, інгібітори комплементу, адренергічні засоби, засоби, що блокують передачу сигналу прозапальними цитокінами, такими як IL-1 (наприклад, IRAK, шляхи передачі NIK-сигналу прозапальними цитокінами, такими як TNF α , IKK, p38 або інгібітори кінази MAP), інгібітори IL-1 β -конвертуючого ферменту, інгібітори TNF α -конвертуючого ферменту, інгібітори передачі Т-клітинного сигналу, такі як інгібітори кінази, інгібітори металопротеїнази, сульфасалазин, азатіоприн, 6-меркаптопурини, інгібітори ангіотензинконвертуючого ферменту, розчинні рецептори цитокінів і їх похідні (наприклад, розчинні рецептори TNF p55 або p75, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) і прозапальні цитокіни (наприклад, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 і TGF β).

Іншими прикладами терапевтичних засобів, з якими може бути об'єднаний DLL4-зв'язувальний білок, є наступні засоби: антагоністи TNF, наприклад анти-TNF антитіла, D2E7 (публікація заявки PCT № WO 97/29131; HUMIRA®), CA2 (REMICADE®), CDP 571, конструкції TNFR-Ig, (p75TNFR-IgG (ENBRELE®) і p55TNFR-IgG (LENERCEPT)) і інгібітори PDE4. Зв'язувальні білки згідно з винаходом можуть бути об'єднані з кортикостероїдами, наприклад з будезонідом і дексаметазоном. Зв'язувальні білки згідно з винаходом можуть бути також об'єднані з такими засобами, як сульфасалазин, 5-аміносалицилова кислота і олсалазин, і з засобами, що блокують синтез або дію прозапальних цитокінів, таких як IL-1, наприклад інгібітори IL-1 β -конвертуючого ферменту і IL-1ra. DLL4-зв'язувальні білки згідно з винаходом можуть бути також використані разом з інгібіторами передачі Т-клітинних сигналів, наприклад з інгібіторами тирозинкінази, 6-меркаптопуринами. DLL4-зв'язувальні білки згідно з винаходом можуть бути об'єднані з IL-11. Зв'язувальні білки згідно з винаходом можуть бути об'єднані з мезаламіном, преднізоном, азатіоприном, меркаптопурином, інфліксимабом, натрію сукцинатом метилпреднізолоном, дифеноксилатом/сульфатом атропіну, гідрохлоридом лопераміду, метотрексатом, омепразолом, фолатом, цiproфлуксацином/декстрозою-водою, бітартратом гідроксидону/APAP, гідрохлоридом тетрацикліну, флуоцинонідом, метронідазолом, тимерозалом/борною кислотою, холестираміном/сахарозою, гідрохлоридом цiproфлуксацину, сульфатом гіосціаміну, гідрохлоридом меперидину, гідрохлоридом мідазоламу, оксикодоном-HCl/ацетамінофеном, гідрохлоридом прометазину, фосфатом натрію, сульфаметоксазолом/триметопримом, цефексимом, полікарбофілом, напсилатом пропоксифену, гідрокортизоном, полівітамінами, балсалазиду динатрієм, фосфатом кодеїну/APAP, колесевелеамом-HCl, ціанокобаламіном, фолієвою кислотою, левофлуксацином, метилпреднізолоном, наталізумабом і інтерфероном-гамма.

Необмежувальними прикладами терапевтичних засобів, з якими може бути об'єднаний зв'язувальний білок згідно з винаходом, є: аспірин, нітрогліцерин, мононітрат ізосорбіду, сукцинат метопрололу, атенолол, тартрат метопрололу, безилат амлодипіну, гідрохлорид дилтіазему, динітрат ізосорбіду, бісульфат клопідогрелю, ніфедипін, аторвастатин кальцію, хлорид калію, фурсемід, симвастатин, верапаміл-HCl, дигоксин, гідрохлорид пропранололу, карведилол, лізиноприл, спіронолактон, гідрохлортіазид, малеат еналаприлу, надолол, раміприл, еноксапарин натрію, натрійвмісний гепарин, валсартан, гідрохлорид соталолу, фенофібрат, езетиміб, буметанід, лозартан калію, лізиноприл/гідрохлортіазид, фелодипін, каптоприл і фумарат бізопрололу.

Фармацевтичні композиції згідно з винаходом можуть включати "терапевтично ефективну кількість" або "профілактично ефективну кількість" зв'язувального білка згідно з винаходом. Термін "терапевтично ефективна кількість" означає кількість, яка, у відповідних дозах і протягом необхідного періоду часу, є ефективною для досягнення бажаного терапевтичного ефекту. Терапевтично ефективна кількість зв'язувального білка може бути визначена самим фахівцем, і така кількість може варіюватися залежно від таких факторів, як тип патологічного розладу, вік, стать і маса індивідуума, а також від здатності зв'язувального білка виробляти бажану відповідь у індивідуума. Терапевтично ефективна кількість також означає кількість, при якій терапевтично сприятливі ефекти перевищують будь-які токсичні або негативні ефекти вказаного зв'язувального білка. Термін "профілактично ефективна кількість" означає кількість, яка, у відповідних дозах і протягом необхідного періоду часу, є ефективною для досягнення бажаного профілактичного ефекту. Звичайно, оскільки профілактична доза вводиться індивідуумам до початку розвитку захворювання або на ранній стадії його розвитку, профілактично ефективна кількість повинна бути меншою терапевтично ефективною кількістю.

Схеми введення доз можуть бути скоректовані для одержання оптимальної бажаної відповіді (наприклад, терапевтичної або профілактичної відповіді). Так, наприклад, протягом певного періоду часу може бути введена одна ударна доза або може бути введено декілька дробових доз, або ця доза

може бути пропорційно знижена або збільшена залежно від терапевтичної ситуації. Для полегшення введення і для досягнення однорідності дози, особливо переважно, якщо композиції для парентерального введення будуть одержані в уніфікованій лікарській формі. Застосовуваний тут термін "уніфікована лікарська форма" означає фізично дискретні одиниці, використовувані як унітарні дози для лікування свавців; причому кожну дозу такої одиниці, що містить попередньо визначену кількість активної сполуки, обчислюють так, щоб досягався бажаний терапевтичний ефект в комбінації з необхідним фармацевтичним носієм. Визначення специфікації дози такої уніфікованої лікарської форми згідно з винаходом безпосередньо залежить від (а) унікальних властивостей активної сполуки і від терапевтичного або профілактичного ефекту, що конкретно досягається, і (b) обмежень, відомих фахівцям і пов'язаних з приготуванням такої активної сполуки, з точки зору сприйнятливості індивідуума до такого лікування.

Репрезентативна і необмежувальна терапевтично або профілактично ефективна кількість DLL4-зв'язувального білка згідно з винаходом складає в межах 0,1-20 мг/кг, а більш переважно 1-10 мг/кг. При цьому потрібно зазначити, що рівні доз можуть варіюватися залежно від типу і тяжкості стану, що піддається лікуванню. Крім того, очевидно, що для будь-якого конкретного індивідуума конкретна схема введення доз повинна бути скоректована залежно від часу, що вимагається для лікування індивідуума, і від призначення лікаря, що здійснює введення або спостереження за введенням таких композицій, причому наведені тут інтервали доз є лише ілюстративними і не обмежують обсяг або практичне застосування заявленої композиції.

Для фахівця в даній галузі абсолютно очевидно, що в описані тут способи можуть бути внесені і інші придатні модифікації і зміни, які можуть бути здійснені з використанням приданих еквівалентів, що не виходять за рамки обсягу даного винаходу або його варіантів, описаних в даній заявці. Хоч даний винахід досить детально описаний в даній заявці, однак, для кращого його розуміння, в цьому описі наводяться посилання на нижченаведені приклади, які представлені лише з метою ілюстрації і не обмежують обсягу винаходу.

Приклади

Приклад 1: In vitro аналізи для визначення функціональної активності анти-DLL4 антитіл

Приклад 1.1. Визначення афінності із застосуванням технології поверхневого плазмонного резонансу BIACORE®

Аналіз із застосуванням технології поверхневого плазмонного резонансу BIACORE® (Biacore, Inc, Piscataway, New Jersey, US) дозволяє визначити афінність антитіл або DVD-Ig шляхом кінетичних вимірювань констант швидкості асоціації і дисоціації. Зв'язування анти-DLL4 антитіл з очищеним рекомбінантним позаклітинним доменом DLL4 визначали методом поверхневого плазмонного резонансу на обладнанні Biacore® (Biacore 2000, Biacore 3000 або Biacore T100; GE Healthcare, Piscataway, New Jersey, US) з використанням робочого буфера HBS-EPB (10 mM HEPES [pH 7,4], 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,1 мг/мл BSA і 0,005% поверхнево-активної речовини P20) при 25 °C. Так, наприклад, приблизно 9000 резонансних одиниць козячого поліклонального антитіла проти людського Fc (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Illinois, US), розведеного в 10 mM ацетату натрію (pH 4,5), безпосередньо іммобілізували на біосенсорному чипі CM5 експериментальної якості за допомогою стандартного набору для зв'язування з аміном відповідно до інструкцій виробників, і ці процедури здійснювали при 25 мкг/мл. Молекули, що не прореагували, на поверхні біосенсора блокували етаноламіном. Для кінетичних аналізів рівняння швидкості асоціації і дисоціації, виведені, виходячи з лангмюрівської моделі зв'язування 1:1, апроксимували одночасно для множини ін'єкцій антигену (шляхом проведення загального емпіричного аналізу) з використанням комп'ютерної програми Scrubber 2 (BioLogic Software), Biacore Biaevaluation 4.0.1 software або оцінної комп'ютерної програми Biacore T100. Очищені антитіла розводили в робочому буфері для захоплення козячого антитіла проти людського Fc, специфічного до реакційної поверхні. Антитіла, які були захоплені як ліганд (1 мкг/мл), ін'єктували на реакційні матриці, при швидкості потоку 10 мкл/хв. У процесі аналізу, як контроль, всі вимірювання були проведені для "пустої" поверхні для захоплення (тобто за відсутності іммобілізованого анти-DLL4 антитіла). Константи швидкості асоціації і дисоціації, K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) і K_{off} (s^{-1}) визначали при постійній швидкості потоку 80 мкл/хв. Константи швидкості асоціації і дисоціації обчислювали шляхом вимірювання кінетики зв'язування при різних концентраціях антигену в межах 1,23-900 nM, одержаних внаслідок серійного 3-кратного розведення, і були включені ін'єкції тільки буфера (використовуваного як подвійний контроль). Потім константу рівноважної дисоціації K_D (M) в реакції між антитілами і антигеном-мішенню обчислювали виходячи з констант швидкості кінетичної реакції за наступною формулою: $K_D = K_{off}/K_{on}$. Потім реєстрували зв'язування залежно від часу і обчислювали константи швидкості кінетичної реакції. У цьому аналізі можуть бути виміряні швидкості асоціації з верхньою межею $10^6 M^{-1}s^{-1}$ і швидкості дисоціації з нижньою межею $10^{-6} s^{-1}$.

Приклад 1.2. Зв'язування анти-DLL4 антитіл з розчинним позаклітинним доменом DLL4, яке було визначене за допомогою ELISA

Метод 1 (ELISA із захопленням)

96-ямкові планшети Nunc-Immuno (#439454) покривали 5 мкг/мл антитіла проти людського IgG

(специфічного до Fc γ -фрагмента, Jackson ImmunoResearch, #109-005-098, 100 мкл/ямку) в D-PBS (Gibco #14190) і інкубували протягом ночі при 4 °C. ELISA-планшети 3 рази промивали промивальним буфером (PBS, 0,05% Твін-20), а потім блокували 200 мкл/ямку блокувального буфера (D-PBS, 1% BSA, 1 mM CaCl₂, 0,05% Твін-20) протягом 1 години при 25 °C. Планшети 3 рази промивали і інкубували зі 100 мкл/ямку анти-DLL4 антитіл (0,0001-100 нМ, 10-кратне серійне розведення в блокувальному буфері) протягом 1 години при 25 °C, а потім знов 3 рази промивали. Планшети, що містять захоплене анти-DLL4 антитіло, інкубували з позаклітинним доменом людського DLL4, міченим біотином (10 нМ в блокувальному буфері, 100 мкл/ямку) протягом 1 години при 25 °C, 3 рази промивали і інкубували зі стрептавідином, кон'югованим з ПХ (KPL #474-3000, розведення 1:10000 в блокувальному буфері, 100 мкл/ямку) протягом 1 години при 25 °C. Після останнього промивання планшети інкубували зі 100 мкл/ямку субстрату для ELISA (1-Step Ultra TMB-ELISA, Pierce #340280). Реакцію припиняли через 2 хвилини при 25 °C додаванням 100 мкл/ямку 2н H₂SO₄ і зчитували оптичну густину на 450 нм. Дані аналізували за допомогою комп'ютерної програми Graphpad Prism і реєстрували величини EC₅₀.

Метод 2 (планшет, покритий міддю)

Перед використанням 96-ямкові планшети, покриті міддю (Thermo Scientific #15143), 3 рази промивали промивальним буфером (PBS, 0,05% Твін-20), а потім інкубували зі 100 мкл/ямку людського DLL4-his або мишачого DLL4-his, або DLL4-his яванського макака при 1 мкг/мл в PBS, протягом 1 години при 25 °C зі струшуванням. Потім планшети 3 рази промивали. Після цього в планшет додавали 100 мкл/ямку рекомбінантних щурячих/людських химерних або рекомбінантних людських анти-DLL4 антитіл (0,00164-27 нМ, 4-кратне серійне розведення в ELISA-буфері = PBST, 10% Superblock (Pierce #37515)) протягом 1 години при 25 °C зі струшуванням, а потім знов 3 рази промивали. Планшети інкубували з ПХ-кон'югованим козячим антилюдським антитілом (Pierce #31412) (розведення 1:40000 в ELISA-буфері, 100 мкл/ямку) протягом 1 години при 25 °C зі струшуванням, а потім 3 рази промивали. Після останнього промивання, планшети інкубували з 100 мкл/ямку субстрату для ELISA (Sigma #T8665). Реакцію припиняли через 8 хвилин при 25 °C додаванням 100 мкл/ямку 1н HCl і зчитували оптичну густину на 450 нм. Дані аналізували за допомогою комп'ютерної програми Graphpad Prism і реєстрували величини EC₅₀.

Приклад 1.3. Зв'язування моноклональних анти-DLL4 антитіл з поверхнею людських пухлинних клітинних ліній, оцінюване за допомогою проточної цитометрії (FACS)

Стабільні клітинні лінії, надекспресуючі DLL4 клітинної поверхні, збирали з колб з клітинною культурою, чотири рази промивали і ресуспендували в забуференому фосфатом фізіологічному розчині (PBS), що містить 1% альбуміну бичачої сироватки і 1 mM CaCl₂ (FACS-буфер). 1,5×10⁵ клітин інкубували з антитілами в різних концентраціях в FACS-буфері протягом 60 хвилин на льоду. Клітини два рази промивали, а потім додавали 50 мкл кон'югованого з R-фікоеритрином F(ab')₂-фрагмента антитіла проти щурячих IgG (розведення 1:200 в FACS-буфері) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, US, Cat.#1 12-116-072). Після інкубування на льоду (4 °C, 60 хвилин) клітини три рази промивали і ресуспендували в FACS-буфері. Флуоресценцію вимірювали на проточному цитометрі Becton Dickinson FACSCalibur-HTS (Becton Dickinson, San Jose, California, US). Дані аналізували з використанням комп'ютерної програми Graphpad Prism, і величини EC₅₀ реєстрували як концентрацію антитіла, при якій рівень зв'язування досягає 50% від максимального рівня зв'язування анти-DLL4 антитіл з DLL4-експресуючими клітинами.

Приклад 1.4. Інгібування взаємодії Notch-1 з розчинним позаклітинним доменом DLL4 під дією анти-DLL4 антитіл (ELISA на конкурентне зв'язування)

96-ямкові планшети Nunc-Immuno (#439454 для ELISA huDLL4) і 96-ямкові планшети Costar (#9018 для ELISA muDLL4) покривали 16 нМ людського Notch-1 (R&D Systems #3647-TK, 100 мкл/ямку в D-PBS) і інкубували протягом ночі при 4 °C. Потім планшети 3 рази промивали промивальним буфером (PBS, 0,05% Твін-20), а потім блокували 200 мкл/ямку блокувального буфера (D-PBS, 1% BSA, 1 mM CaCl₂, 0,05% Твін-20) протягом 1 години при 25 °C. При блокуванні мічений біотином людський позаклітинний домен DLL4 (14 нМ) змішували з антитілом (30 пМ-66 нМ, 3-кратне серійне розведення в блокувальному буфері) протягом 1 години при 25 °C зі струшуванням. Після блокування аналітичні планшети промивали і інкубували з сумішами DLL4/антитіло (100 мкл/ямку, 1 год. при 25 °C зі струшуванням). Потім планшети знов промивали і додавали 100 мкл/ямку стрептавідину, кон'югованого з ПХ (Fitzgerald #65R-S104PHRPx, розведення 1:5000 в блокувальному буфері), і залишали на 1 годину при 25 °C зі струшуванням. Після останнього промивання планшети проявляли з використанням 100 мкл/ямку субстрату (TMB Sigma #T8665), реакцію припиняли після 8-хвилинного інкубування при 25 °C (для ELISA muDLL4), а потім інкубували 20 хвилин при 25 °C (для ELISA huDLL4) з використанням 100 мкл/ямку 1н HCl, і оптичну густину зчитували на 450 нм. Дані аналізували за допомогою комп'ютерної програми Graphpad Prism, і величини IC₅₀ реєстрували як концентрацію антитіла, при якій досягається 50%-е зниження рівня зв'язування DLL4 з Notch-1.

Приклад 1.5. Блокування зв'язування розчинного Notch з DLL4-надекспресуючими клітинами 293G під дією моноклональних анти-DLL4 антитіл, оцінюване за допомогою проточної цитометрії (FACS на

конкурентне зв'язування)

Аналіз на блокування Notch. Коротко, стабільні клітинні лінії, надекспресуючі DLL4 клітинної поверхні, збирали з колб для культивування тканини і ресуспендували в забуференому фосфатом фізіологічному розчині (PBS), що містить 1% альбумін бичачої сироватки і 1 mM CaCl₂ (FACS-буфер). HEK293-hDLL4- або HEK293-mDLL4-клітини розподіляли по 96-ямковому планшету (з V-подібним дном) при густині $1,5 \times 10^5$ клітин/ямку в FACS-буфері. Після центрифугування клітин і відкидання супернатанту, в кожну ямку додавали 50 мкл очищеного IgG з відповідним розведенням і інкубували на льоду при 4 °C протягом 60 хвилин, а потім додавали 50 мкл/ямку Notch-1-біотину при 0,2 мкг/мл для hDLL4-293G або 2,0 мкг/мл для mDLL4-293G (1,0 або 0,1 мкг/мл кінцевого розчину) і додатково інкубували ще 1 годину на льоду при 4 °C. Після двократного промивання клітин FACS-буфером додавали 50 мкл стрептавідину, кон'югованого з R-фікоеритрином (розведення 1:150 в FACS-буфері) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, US, catalog no. 016-110-084). Після інкубування на льоду (4 °C, 60 хвилин) клітини три рази промивали і ресуспендували в FACS-буфері. Флуоресценцію вимірювали на проточному цитометрі Becton Dickinson FACSCalibur-HTS (Becton Dickinson, San Jose, California, US). Дані аналізували з використанням комп'ютерної програми Graphpad Prism, і величини EC₅₀ реєстрували як концентрацію, при якій досягається 50%-е зниження рівня зв'язування Notch-1 з DLL4-експресуючими клітинами.

Приклад 1.6. Інгібування DLL4-залежного збільшення рівня sVEGFR1 (sFLT1) в клітинах EA.hy926 під дією анти-DLL4 антитіл

96-ямкові планшети з тканинною культурою покривали 100 мкл/ямку людського позаклітинного домену DLL4 при 1,67 мг/мл в D-PBS (Gibco #14190) і інкубували протягом ночі при 4 °C. Потім планшети один раз промивали D-PBS, і клітини EA.hy926 висівали при густині 4000 клітин/ямку за відсутності або в присутності антитіл. Проліферацію клітин вимірювали через чотири дні з використанням набору для аналізу на проліферацію клітин CyQUANT (Invitrogen, #C35007). Експресію sVEGFR1 в кондиціонованому середовищі детектували за допомогою набору для ELISA відповідно до інструкцій виробників (R&D Systems #DVR100B). Рівні sVEGFR1 нормалізували по RFU, визначених за допомогою аналізу CyQUANT, з урахуванням відмінностей в проліферації клітин.

Приклад 1.7. Інгібування DLL4-залежної активації Notch в клітинах EA.hy926 під дією анти-DLL4 антитіл за допомогою аналізу на Notch-репортер

У 96-ямкові чорні планшети з прозорим дном для культивування тканин висівали 7000 сконструйованих клітин EA.hy926/ямку, експресуючих люциферазу, індуквану Notch-чутливим промотором. Антитіла серійно розводили, виходячи з концентрації 200 nM, і змішували протягом 15 хвилин з рівним об'ємом 5000 клітин HEK293G/ямку, експресуючих повнорозмірний DLL4. Клітини 293G/DLL4 культивували разом з Notch-репортервмісними клітинами EA.hy926 протягом 24 годин в присутності тестованих антитіл. Люциферазну активність аналізували з використанням субстрату Promega (Promega # E2940).

Приклад 1.8. Методи аналізу і методика визначення ідентичності молекул і їх фізико-хімічних властивостей

Метод ПЕГ-преципітації

Використання ПЕГ для індукування фазового фракціонування твердого білка відповідно до принципу витіснення об'єму являє собою придатний спосіб оцінки розчинності білка. Використання ПЕГ, в порівнянні з іншими осаджувальними речовинами, має декілька переваг, включаючи мінімальну денатурацію білків при температурах навколишнього середовища (що не впливає на третинну структуру білка) і відсутність необхідності в регуляції температури в межах від 4 °C до 30 °C, тобто дослідження по преципітації можуть бути проведені при температурі навколишнього середовища в лабораторних умовах.

Звичайно преципітацію білків за допомогою ПЕГ можна пояснити ефектом витіснення об'єму. Відповідно до цієї теорії, білки стерично витісняються з областей розчинника, які зайняті лінійними ланцюгами ПЕГ. У результаті білки концентруються і, зрештою, осаджуються, якщо вони мають надмірну розчинність. З точки зору термодинаміки, стеричне витіснення приводить до збільшення хімічного потенціалу білка доти, поки він не перевищить хімічний потенціал білка, який знаходиться в абсолютно твердому стані, що буде приводити до преципітації білка. Це відбувається, головним чином, через небажану високу вільну енергію взаємодії між ПЕГ і білками і приводить до зниження бажаної гідратації білка, що зумовлено ефектами стеричного витіснення. У водних розчинах така переважна гідратація сприяє збереженню нативної структури білків. Було показано, що витіснення об'єму стає більш ефективним при збільшенні молекулярної маси ПЕГ, тобто із зростанням молекулярної маси ПЕГ потрібна менша кількість ПЕГ для преципітації білків.

Молекулярна маса ПЕГ 3000 була вибрана для оцінки розчинності антитіл, які входять в обсяг даного винаходу. 50%-й розчин ПЕГ одержували шляхом розчинення ПЕГ в деіонізованій воді у відношенні один грам ПЕГ на 1 мл води. Потім розчин ПЕГ додавали до розчину антитіла, вихідна концентрація якого становила 0,5 мг/мл або менше, а об'єм становив 0,5 мл. Після цього постійно

додавали розчин ПЕГ і змішували до першої появи стійкої каламутності. Процент ПЕГ 3000, необхідний для досягнення такої преципітації, обчислювали як 50 x (об'єм доданого розчину ПЕГ 3000/вихідний об'єм розчину антитіла перед додаванням ПЕГ).

Процент ПЕГ 3000, необхідний для досягнення такої преципітації білка, порівнювали з процентом, необхідним для преципітації білка з відомою водорозчинністю. Так, наприклад, водорозчинність адалімумабу перевищує 200 мг/мл. Отже, якщо процент, необхідний для преципітації білка, що представляє інтерес, аналогічний проценту, необхідному для преципітації адалімумабу, то передбачувана розчинність цього білка аналогічна розчинності адалімумабу.

Метод визначення істинної розчинності

Істинну розчинність визначали з використанням центрифужних фільтрів Amicon для концентрування білка в розчині доти, поки не спостерігалось осадження білка з розчину, або доти, поки не був досягнутий мінімальний об'єм, при якому білок може концентруватися в фільтруючому пристрої. У останньому випадку 15-мілілітрові центрифужні фільтри Amicon мають мінімальний об'єм приблизно 50 мкл, а 4-мілілітрові центрифужні фільтри Amicon мають мінімальний об'єм приблизно 15 мкл.

Спочатку білок діалізували з одержанням відповідного(их) складу(ів). У цих дослідженнях кількість антитіла становила 10 мг або набагато менше. Потім розчин білка поміщали в камеру центрифужного фільтра Amicon для ретентату. Цю камеру приєднували до нітроцелюлозної мембрани з порами, які дозволяють молекулам, що мають менше ніж 10-30 кілодальтон, проходити під дією відцентрової сили. Антитіла, розмір яких звичайно становить 140 кілодальтон, утримувалися, а вода, буферні молекули, невеликі наповнювачі і солі проходили через пори. Потім фільтр центрифуги обертати відповідно до інструкцій виробника доти, поки не спостерігалось осадження білка з розчину, або доти, поки не був досягнутий мінімальний об'єм, при якому білок може концентруватися в фільтруючому пристрої.

Після центрифугування розчин білка видаляли з камер для ретентату і вимірювали концентрацію по поглинанню ультрафіолету. Потім розчин залишали на 1-2 дні при 25 °C і 5 °C і проводили моніторинг на ознаки осадження.

Методи спектроскопії кругового дихроїзму (КД) в ближньому УФ-діапазоні

КД-спектроскопія в області ближнього УФ дає важливу інформацію про третинну структуру білків і є одним з найбільш широко застосовуваних методів для цих цілей. КД означає диференціальне поглинання складових плоскополяризованого випромінювання з лівою і правою круговою поляризацією. Для білків хромофорами, що мають спектр КД в області ближнього УФ (250-320 нм), є ароматичні амінокислоти, тобто триптофан, тирозин і фенілаланін і дисульфідні зв'язки, а КД-ефект спостерігається в тому випадку, якщо хромофори мають асиметричну (приховану) конформацію. Сигнали в області від 250 до 270 нм відповідають фенілаланіновим залишкам, сигнали в області від 270 до 290 нм відповідають тирозину, сигнали в області від 280 до 300 нм відповідають триптофану. Дисульфідні зв'язки дають широкі слабкі сигнали по всьому спектру ближнього УФ. КД-спектр в ближньому УФ може бути чутливим до невеликих змін третинної структури, наприклад до змін, що викликаються взаємодіями білок-білок, і/або змін умов одержання складу.

Існує також ряд інших факторів, які можуть впливати на КД-спектри ароматичних амінокислот. Такими факторами, серед інших, є: (1) жорсткість молекули білка, (2) природа водневих зв'язків і (3) взаємодії між різними ароматичними амінокислотами. Крім того, білки з великою кількістю амінокислот можуть мати більш дрібні КД-смуги, що зумовлено гасінням позитивних і негативних смуг.

Коротко, білок діалізували з одержанням потрібного(их) складу(ів) при 1 мг/мл і сканували на довжині хвилі 250-320 нм або 240-320 нм на КД-спектрометрі Jasco 800. Також сканували відповідний склад без білка, і зареєстровані дані віднімали з даних, одержаних в результаті сканування розчину білка. КД-спектр в ближньому УФ являє собою графік залежності молярної еліптичності від довжини хвилі в області від 250 або 240 до 320 нм.

Загалом, для антитіл КД-спектр в ближньому УФ з напівсигмоїдним профілем вказує на хороше укладання третинної структури, а більш плоский і менш чітко виражений профіль вказує на значну тенденцію до розгорнення білка. Компактне укладання асоціюється з хорошою стабільністю, тоді як погане укладання вказує на внутрішню частину, яка може викликати гідрофобні взаємодії між молекулами білка і приводити до утворення небажаних агрегатів.

ДСК-технологія

Термостабільність антитіл оцінювали на ДСК-обладнанні. Використовуване ДСК-обладнання являє собою автоматизоване VP-ДСК-обладнання, забезпечене капілярними комірками (Microcal, GE Healthcare Ltd./Microcal, Buckinghamshire, UK). Дослідження по розгорненню молекул оцінювали шляхом сканування при швидкості 1 °C/хв. при температурі 25-95 °C для 1 мг/мл зразка. Додатковими параметрами вимірювань є період апроксимації 16 секунд і час очікування перед скануванням, що становить 10 хвилин, де вказані вимірювання проводили в режимі відсутності зворотного зв'язку. Для кожного конкретного вимірювання 420 мкл зразка/контролю поміщали в тримач для зразків вимірювального ДСК-пристрою згідно зі схемою заповнення планшетів, описаною нижче. Одержані

термограми були побудовані для двох нестационарних моделей з метою одержання середніх температур і ентальпії різних переходів.

Додатковою вимогою, що пред'являється до кандидата на успішне його використання в біологічних дослідженнях, є збереження нативного стану і конформації білка. Білок у водному розчині знаходиться в рівновазі між його нативною (укладеною) конформацією і денатурованою (розгорненою) конформацією. Стабільність білка в нативному стані визначається величиною вільної енергії Гіббса (DG) даної системи і термодинамічним взаємозв'язком між змінами ентальпії (DH) і ентропії (DS). Позитивна DG вказує на те, що нативний стан є більш стабільним, ніж денатурований стан, тобто чим вище позитивна DG, тим вище стабільність. Для розгорнення білка стабілізуючі сили повинні бути усунені. Конформаційна ентропія долає стабілізуючі сили, що приводить до розгорнення білка при температурах, при яких ентропія стає домінуючою. ДСК дозволяє вимірювати DH розгорнення білка в результаті теплової денатурації. Згідно із загальним законом термодинаміки можна стверджувати, що чим вище середня температура переходу (T_m), тим більш стабільним є білок при більш низьких температурах. При проведенні тієї самої експериментальної ДСК можна також вимірювати зміну теплоємності (DC_p) для денатурації білка. Зміни теплоємності, асоційовані з розгорненням білка, зумовлені, головним чином, змінами характеру гідратації бічних ланцюгів, які приховані в нативному стані, але стають більш доступними для розчинника в денатурованому стані. Було показано, що ДСК є цінним прогностичним фактором стабільності білків і інших біологічних макромолекул в рідких складах (Remmele and Gombotz, *BioPharm.*, 13: 36-46 (2000), і Remmele et al., *Pharm. Res.*, 15: 200-208 (1998)).

ЕХ-технологія

Ексклюзійна хроматографія застосовується для розділення білків по розміру. Білки, що містяться у водній рухомій фазі, пропускають через пористу смолу, упаковану як стаціонарна фаза на колонці. Час утримування в колонці залежить від гідродинамічного розміру білка і розміру пор шару упакованої смоли. Більш дрібні молекули можуть проникати в менші пори в смолі і утримуються довше, ніж більш великі молекули. Після елюювання з колонки білки детектували по УФ-поглинанню. У ЕХ-методі використовували захисний гель TSK (TOSOH Biosciences, Montgomeryville, Pennsylvania, US, cat. no. 08543) і гель TSK G3000SWxL (TOSOH Biosciences, Montgomeryville, Pennsylvania, US, cat. no. 08541). Як рухому фазу використовували 100 мМ Na_2HPO_4 , 200 мМ Na_2SO_4 , pH 6,8. Швидкість потоку становила 0,25 мл/хв. Об'єм впорскування становив 20 мкл від 1 мг/мл зразка. Колонка мала кімнатну температуру. Температура автоматичного пристрою для взяття зразків становила 2-8 °C. Загальний час проведення процедури становив 55 хвилин. Детектування проводили по УФ-поглинанню на довжині хвилі 214 нм, де ширина смуги становила 8 нм, причому як стандарт використовували поглинання на довжині хвилі 360 нм з шириною смуги 100 нм.

Метод заморожування-розморожування

Розчини антитіл в потрібному складі в концентрації 1 мг/мл заморожували при -80 °C протягом щонайменше 4 годин, а потім розморожували при 30 °C на водяній бані. Потім розчин знов заморожували при -80 °C. Таким чином, проводили 5 циклів заморожування-розморожування. Після проведення певних циклів заморожування-розморожування, наприклад другого і четвертого циклів, частина розчину може бути взята для ЕХ-аналізу з подальшим повторним заморожуванням. Аналіз стабільності в умовах заморожування-розморожування проводили при низьких концентраціях білка для одержання "гіршого сценарію", зумовленого більш високою імовірністю денатурації молекул білка на границі розділу "лід-вода". При більш високих концентраціях імовірність співударення білка з поверхнею розділу "лід-вода" прямо пропорційно знижується, а замість цього, він стикається з іншими молекулами білка.

Прискорений метод визначення стабільності

Розчини антитіл в потрібному складі в концентрації 1 мг/мл пропускали через ПВДФ-фільтри з розміром пор 0,22 мкм в стерильних умовах і інкубували при 40 °C і/або 50 °C протягом щонайменше 21 дня. На 7 і 21 дні брали аліквати в стерильних умовах і піддавали ЕХ-аналізу. Потім розчини знов інкубували.

Приклад 2: Протестування і виділення людських моноклональних анти-DLL4 антитіл E9 і A10 із застосуванням технології представлення мПНК PROfusion

З застосуванням технології представлення мПНК PROfusion (див. Chung-Ming Hsieh et al., публікацію заявки на патент США № 2010/0099103), за сім раундів відбирали об'єднані бібліотеки антитіл проти антигенів DLL4 селезінки і лімфоузлів: 100 нМ міченого біотином позаклітинного домену людського DLL4 (раунди 1 і 2), суміші 50 нМ міченого біотином позаклітинного домену людського DLL4 і 50 нМ міченого біотином позаклітинного домену мишачого DLL4 (раунд 3), 100 нМ міченого біотином позаклітинного домену людського DLL4 (раунди 4 і 5), клітин 293G, стабільно експресуючих людський DLL4, і 100 нМ міченого біотином позаклітинного домену людського DLL4 (раунд 6), і клітин BAF3, стабільно експресуючих людський і мишачий DLL4 (раунд 7). A10 і E9 ідентифікували після відбору бібліотек антитіл в раунді 7 (таблиця 4). При конструюванні людського IgG1 дикого типу ці конструкції позначали A10.1 і E9.1, відповідно.

Таблиця 4

Дані про послідовності клонів E9 і A10 повністю людських анти-DLL4 антитіл PROfusion (CDR, пронумеровані по Кебату, підкреслені)

Клон	Джерело	Ізотип	V-область	Зародко- ва лінія	Послідовність
					12345678901234567890
E9	Людські лімфо- вузли	huIgG1: VL(λ), VH(L234, 235A)	VH	VH4-39	EVQLQESGPGGLVKPSETLSL TCTVSGGSISSSSYYWGWR QPPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARE DVILRGGS DYWGQGT LVTVS S (SEQ ID NO:1)
			VL	V2-1	SYELTQPPSVSVSPGQTASI TCSGQRLGDKYASWYQQKPG QSPVLVIYEDSKRPSGIPER FSGSNSGDTATLTISGTQPM DEADYYCQAWDRDTGVFGYG TRVTVL (SEQ ID NO:111)
A10	Людська селезінка	huIgG1: VL(λ), VH(L234, 235A)	VH	VH3-30	EVQLLES GGGGLVKSGGSLRL SCAASGFTFRSHWMSWVRQA PGKGLEWVAIISYDGSNKYS ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQLNSLR AEDTAVYYCAKAG GGNVGF DIWGQGTMTVSS (SEQ ID NO:112)
			VL	V2-1	LPVLTQPPSVSVSPGQTASI TCSADKLGTKYVSWYQQKPG QSPVLVIYQDAKRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQTM DEADYLCQSWDRSDVVFSGG TKVTVL (SEQ ID NO:113)

Приклад 3: Характеризація in vitro антитіл E9 і A10 PROfusion

Афінність зв'язування з антигеном DLL4 для антитіл E9 і A10 визначали із застосуванням BIACORE-технології, як описано в прикладі 1.1. Як показано нижче в таблиці 5, E9 і A10 мають аналогічні величини констант рівноважної дисоціації відносно людського DLL4 ($K_D=3,36$ і $6,68$ нМ, відповідно) і DLL4 яванського макака ($K_D=4,2$ і $7,8$ нМ, відповідно). E9 також перехресно реагує з мишачим і щурячим DLL4 (K_D 16 і 15 нМ, відповідно).

Таблиця 5

Кінетика зв'язування анти-DLL4 антитіл
PROfusion, оцінювана методом Biacore

	Кінетика по Biacore											
MAb	huDLL4 ECD			cynoDLL4 ECD			muDLL4 ECD			ratDLL4 ECD		
	K _a	K _d	K _D	K _a	K _d	K _D	K _a	K _d	K _D	K _a	K _d	K _D
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

MAb = моноклональне антитіло; E = порядок величини (величина, помножена на 10, тобто означає експоненту; K_a (M⁻¹s⁻¹); K_d (с⁻¹); K_D (нМ); NB = не зв'язується (900 нМ DLL4).

Активність зв'язування антитіла з антигеном також оцінювали за допомогою ELISA- і FACS-аналізів (як описано в прикладі 1.2, 1.3, де величини EC₅₀ представлені в таблиці 3). Антитіла E9 і A10, крім їх зв'язування з рекомбінантним позаклітинним доменом DLL4 (ECD), можуть також зв'язуватися з DLL4, експресованим на клітинній поверхні (таблиця 6).

Здатність антитіл блокувати взаємодію DLL4 з рецептором Notch-1 оцінювали за допомогою ELISA- і FACS-аналізів на конкурентне зв'язування, описаних в прикладах 1.4 і 1.5. Як показано в таблиці 6, E9 і A10 ефективно блокують взаємодію Notch-1 з DLL4 (в формі позаклітинного домену (ECD) і в клітинно-асоційованій формі). Крім того, клітинні функціональні аналізи були також розроблені для визначення здатності антитіл нейтралізувати DLL4-опосередовану клітинну активність *in vitro* (як описано в прикладах 1.6 і 1.7). Антитіла E9 і A10 інгібували DLL4-індуковану активацію Notch і експресію sVEGFR1 в клітинах EA.hy926 (таблиця 6).

Таблиця 6

Активність анти-DLL4 антитіла PROfusion *in vitro*

	Аналізи на пряме зв'язування						Аналізи на функціональне блокування							
MAb	ELISA з захопленням (EC ₅₀ , нМ)				FACS (EC ₅₀ , нМ)		ELISA на конкурентне зв'язування (IC ₅₀ , нМ)			FACS на конкурентне зв'язування (IC ₅₀ , нМ)		Інгібування sVEGFR1 (IC ₅₀ , нМ)		Інгібування активації Notch в співкультурі huDLL4-клітин (IC ₅₀ , нМ)
	ECD DLL4				DLL4-клітини		ECDDLL4/huNotch-1			huNotch-1/DLL4-клітини		DLL4-ECD/клітин EaHy		
	hu	mu	cyno		hu	mu	hu	mu	cyno	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 = моноклональне антитіло; hu = людські; mu = мишачі; cyno = яванського макака.

Приклад 4: Афіне дозрівання антитіл E9 і A10 PROfusion

Афіне дозрівання анти-DLL4 антитіла E9

Вирівнювання послідовностей показало, що анти-DLL4 антитіло E9 має найбільш високу ідентичність з VH4-39/JH4 і V2-1/JL6 людських зародкових ліній. Для підвищення афінності E9 до DLL4, залишки гіперматованої CDR ідентифікували, виходячи з інших послідовностей людських антитіл, що є в базі даних IgBLAST, які також виявляють високу ідентичність з VH4-39 і V2-1 зародкової лінії. Потім відповідні залишки CDR E9 піддавали обмеженому мутагенезу за допомогою ПЛР з використанням праймерів, що мають низьку вродженість кодів в цих положеннях, з метою створення бібліотек антитіл в форматі scFv, придатному для їх застосування в процедурі дозрівання афінності. Перша бібліотека містила мутації в положеннях залишків 30, 31, 32, 33, 50, 54, 56 і 65 в CDR1 і CDR2 VH (нумерація по Кебату); друга бібліотека містила мутації в положеннях залишків 95-100, 100a, 100b, 100c і 102 в CDR3 VH; а третя бібліотека містила мутації в положеннях залишків 27, 30, 31, 33, 52, 53, 93-96 в трьох CDR VL. Для подальшого підвищення ідентичності E9 з послідовностями каркасної області людської зародкової лінії, залишок Arg в положенні VL 103

замінювали залишком Lys, а в третю бібліотеку також вносили подвійну виродженість в положеннях 80 (A/P) і 100 (S/Y) VL (таблиця 7).

Таблиця 7

Мутації в амінокислотній послідовності VH і VL E9,
введені для ініціації дозрівання афінності

Мутована послідовність		VH E9 (SEQ ID NO: 114)	
EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYYTGSTYY			
		NNGN	S
		G NT	L
		R G	
		R	
			N N N
			A T
			I G
			S
			R
NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDVILRGGSDYWGQGTLLTVSS			
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
Мутована послідовність		VL E9 (SEQ ID NO: 115)	
SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPER			
		ES E V	Q LT
		DG	TE
		M	AN
		K	EQ
		L	FS
		T	M
FSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTTRVTVL			
	A	SEVA	S K
		M AC	
		E S	
		N M	
		K	

Ці бібліотеки E9 переносили в клітини і представляли на клітинній поверхні для відбору на позаклітинний домен біотинільованого DLL4 з низькою концентрацією методом магнітної візуалізації, а потім методом клітинного сортиру з активацією флуоресценції (FACS). Потім проводили відбір на більш високі величини констант асоціації, дисоціації або тих і інших, після чого послідовності білків-антитіл клонів E9 з модульованою афінністю (таблиця 8) регенерували для зворотного перетворення в формат IgG для подальшої характеристики.

Таблиця 8

Послідовності білків-клонів антитіл, ідентифікованих,
виходячи з бібліотек дозрівання афінності для анти-DLL4 антитіла E9

Афінно зрілі клони: області важкого ланцюга (VH)			
E9.4	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARYDVSLGGSSDH WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:116)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:117)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:118)	YDVSLGGSSDH (SEQ ID NO:119)
E9.11	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREAVPLGGGSDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:120)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:121)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:122)	EAVPLGGGSDY (SEQ ID NO:123)
E9.14	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSNSRYHWGWIRQSPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:124)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	NSRYHWG (SEQ ID NO:125)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:126)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:127)
E9.17	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREEAILGGGSDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:128)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:129)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:130)	EEAILGGGSDY (SEQ ID NO:131)
E9.18	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSGYYWGWIRQPPGKGLEWIGDINY AGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:132)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSGYWG (SEQ ID NO:133)	DINYAGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:134)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:135)
E9.19	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARFDVSLGGGSDT WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:136)		

	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:137)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:138)	FDVSLGGGSDT (SEQ ID NO:139)
E9.22	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISNSRYHWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKGRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:140)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	NSRYHWG (SEQ ID NO:141)	DIYYTGSTYYNPSLKG (SEQ ID NO:142)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:143)
E9.48	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSGYWGWIRQPPGKGLEWIGDINY RGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:144)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSGYWG (SEQ ID NO:145)	DINYRGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:146)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:147)
E9.65	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIRNSRYHWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKGRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:148)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	NSRYHWG (SEQ ID NO:149)	DIYYTGSTYYNPSLKG (SEQ ID NO:150)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:151)
E9.66	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREGVPLGGADK WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:152)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:153)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:154)	EGVPLGGADK (SEQ ID NO:155)
E9.71	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARQALAMGGGSDK WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:156)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:157)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:158)	QALAMGGGSDK (SEQ ID NO:159)
E9.13	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:160)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:161)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:162)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:163)
E9.16	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY TGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:164)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:165)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:166)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:167)
E9.38	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYY		

	TGSTYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDVILRGGSDY WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:168)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:169)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:170)	EDVILRGGSDY (SEQ ID NO:171)
E9.2B	EVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGGSISSSNYYWG WIRQPPGKGLEWIGDINY NGNTYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREAVLGGGADD WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:172)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSNYYWG (SEQ ID NO:173)	DINYNGNTYYNPSLKS (SEQ ID NO:174)	EAVLGGGADD (SEQ ID NO:175)
E9.1F	EVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGGSISSGSYWG WIRQPPGKGLEWIGDINY IGSTYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREAVSFGGGADS WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:176)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGSYWG (SEQ ID NO:177)	DINYIGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:178)	EAVSFGGGADS (SEQ ID NO:179)
E9.10II	EVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGGSIS SSGYWG WIRQPPGKGLEWIG DIYY TGNTYYNPSLKN RVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARE EEVILGGGADQ WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:180)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSGYWG (SEQ ID NO:181)	DIYYTGNTYYNPSLKN (SEQ ID NO:182)	EEVILGGGADQ (SEQ ID NO:183)
E9.5E	EVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGGSIS SSSYWG WIRQPPGKGLEWIG DINY IGSTYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARE SVPLGGGADE WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:184)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:185)	DINYIGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:186)	ESVPLGGGADE (SEQ ID NO:187)
E9.10C	EVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGGSIS SGSYWG WIRQPPGKGLEWIG DIYY TGSTYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR QAVMYGGGSDN WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:188)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGSYWG (SEQ ID NO:189)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:190)	QAVMYGGGSDN (SEQ ID NO:191)
E9.7E	EVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGGSIS SSSYWG WIRQPPGKGLEWIG DIYY AGSTYYNPSLKD RVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARE DMILGGGADN WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:192)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYWG (SEQ ID NO:193)	DIYYAGSTYYNPSLKD (SEQ ID NO:194)	EDMILGGGADN (SEQ ID NO:195)
E9.12B	EVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGGSIS SSNYYWG WIRQPPGKGLEWIG DIYY TGSTYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARE AVSFGGGADS WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:196)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSNYYWG (SEQ ID NO:197)	DIYYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:198)	EAVSFGGGADS (SEQ ID NO:199)

E9.10E	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIN SGNYYWG WIRQPPGKGLEWIG DISYTGSTYYNPSLKS RVVTISVDTSKNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARE EDVMYGGGGDS WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:200)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGNYYWG (SEQ ID NO:201)	DISYTGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:202)	EDVMYGGGGDS (SEQ ID NO:203)
E9.6A	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SSSYW WIRQPPGKGLEWIG DINYAGSTYYNPSLKN RVVTISVDTSKNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARE EAVALGGGADS WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:204)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYW (SEQ ID NO:205)	DINYAGSTYYNPSLKN (SEQ ID NO:206)	EAVALGGGADS (SEQ ID NO:207)
E9.7A	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SSSYW WIRQPPGKGLEWIG DINYAGSTYYNPSLKS RVVTISVDTSKNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARE EDVKFGGGADL WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:208)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SSSYW (SEQ ID NO:209)	DINYAGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:210)	EDVKFGGGADL (SEQ ID NO:211)
E9.8H	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SGSYW WIRQPPGKGLEWIG DIYYTGSTYYNPSLKN RVVTISVDTSKNQPSLKLSSVTAADTAVYYCARE ESVPLGGGADN WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:212)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGSYW (SEQ ID NO:213)	DIYYTGSTYYNPSLKN (SEQ ID NO:214)	ESVPLGGGADN (SEQ ID NO:215)
Афінно зрілі клони: області легкого ланцюга (VL)			
E9.13	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDTLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSERPSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDSETGVFGSGTKVTVL (SEQ ID NO:216)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGDTLGDKYVS (SEQ ID NO:217)	EDSERPS (SEQ ID NO:218)	QAWDSETGV (SEQ ID NO:219)
E9.16	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGERLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDFKRPSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:220)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGERLGDKYVS (SEQ ID NO:221)	EDFKRPS (SEQ ID NO:222)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:223)
E9.38	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDVGTVFGSGTKVTVL (SEQ ID NO:224)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYVS (SEQ ID NO:225)	EDSKRPS (SEQ ID NO:226)	QAWDRDVGTV (SEQ ID NO:227)
E9.4	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS		

	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:228)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:229)	EDSKRPS (SEQ ID NO:230)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:231)
E9.11	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:232)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:233)	EDSKRPS (SEQ ID NO:234)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:235)
E9.14	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:236)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:237)	EDSKRPS (SEQ ID NO:238)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:239)
E9.17	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:240)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:241)	EDSKRPS (SEQ ID NO:242)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:243)
E9.18	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:244)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:245)	EDSKRPS (SEQ ID NO:246)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:247)
E9.19	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:248)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:249)	EDSKRPS (SEQ ID NO:250)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:251)
E9.22	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:252)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:253)	EDSKRPS (SEQ ID NO:254)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:255)
E9.48	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO:256)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO:257)	EDSKRPS (SEQ ID NO:258)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO:259)

E9.65	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGT KVTVL (SEQ ID NO: 260)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO: 261)	EDSKRPS (SEQ ID NO: 262)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO: 263)
E9.66	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO: 264)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO: 265)	EDSKRPS (SEQ ID NO: 266)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO: 267)
E9.71	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDRDTGVFGYGTKVTVL (SEQ ID NO: 268)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGQRLGDKYAS (SEQ ID NO: 269)	EDSKRPS (SEQ ID NO: 270)	QAWDRDTGV (SEQ ID NO: 271)
E9.2B	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGEGLDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSTRPSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDSETGVFGSGTKVTVL (SEQ ID NO: 272)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGEGLDKYVS (SEQ ID NO: 273)	EDSTRPS (SEQ ID NO: 274)	QAWDSETGV (SEQ ID NO: 275)
E9.1F	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDRLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSQRPSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDMEAGVFGSGTKVTVL (SEQ ID NO: 276)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGDRLGDKYVS (SEQ ID NO: 277)	EDSQRPS (SEQ ID NO: 278)	QAWDMEAGV (SEQ ID NO: 279)
E9.10 C	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDSLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSERPSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSETGVFGSGTKVT (SEQ ID NO: 280)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGDSLGDKYVS (SEQ ID NO: 281)	EDSERPS (SEQ ID NO: 282)	QAWDSETGV (SEQ ID NO: 283)
E9.10 E	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGEGLDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSERPSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSEAGVFGSGTKVT (SEQ ID NO: 284)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGEGLDKYVS (SEQ ID NO: 285)	EDSERPS (SEQ ID NO: 286)	QAWDSEAGV (SEQ ID NO: 287)
E9.7E	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDRLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSERPSGIPERFSGSNSGDTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSEAGVFGSGTKVT (SEQ ID NO: 288)		

	CDR1	CDR2	CDR3
	SGDRLGDKYVS (SEQ ID NO:289)	EDSERPS (SEQ ID NO:290)	QAWDSEAGV (SEQ ID NO:291)
E9.5E	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDMLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSQRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC QAWDSETGV FGSGTKVT (SEQ ID NO:292)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGDMLGDKYVS (SEQ ID NO:293)	EDSQRPS (SEQ ID NO:294)	QAWDSETGV (SEQ ID NO:295)
E9.12 B	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDGLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSTRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC QAWDSESGV FGSGTKVT (SEQ ID NO:296)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGDGLGDKYVS (SEQ ID NO:297)	EDSTRPS (SEQ ID NO:298)	QAWDSESGV (SEQ ID NO:299)
E9.10 H	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGESLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDGETGV FGSGTKVT (SEQ ID NO:300)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGESLGDKYVS (SEQ ID NO:301)	EDSKRPS (SEQ ID NO:302)	QAWDGETGV (SEQ ID NO:303)
E9.6A	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDMLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDTNRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSETGV FGSGTKVT (SEQ ID NO:304)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGDMLGDKYVS (SEQ ID NO:305)	EDTNRPS (SEQ ID NO:306)	QAWDSETGV (SEQ ID NO:307)
E9.7A	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGESLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYQDAMRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDMETGV FGSGTKVT (SEQ ID NO:308)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGESLGDKYVS (SEQ ID NO:309)	QDAMRPS (SEQ ID NO:310)	QAWDMETGV (SEQ ID NO:311)
E9.8H	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGESLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYEDSMRPS GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC QAWDSEGV FGSGTKVT (SEQ ID NO:312)		
	CDR1	CDR2	CDR3
	SGESLGDKYVS (SEQ ID NO:313)	EDSMRPS (SEQ ID NO:314)	QAWDSEGV (SEQ ID NO:315)

Афінне дозрівання анти-DLL4 антитіла A10

Аналогічно дозріванню афінності E9, описаному вище, вирівнювання послідовностей показало, що анти-DLL4 антитіло A10 має найбільш високу ідентичність з VH3-30 і V2-1 людських зародкових ліній. Людські послідовності VH і VL, що походять від VH3-30 і V2-1, відповідно, брали з бази даних NCBI IgBlast для створення логосу послідовності. Ці логоси використовували для того, щоб вирішити, які саме послідовності повинні бути введені для генерування афінно зрілих бібліотек.

Бібліотеки A10 переносили в клітини і представляли на клітинній поверхні для відбору на позаклітинний домен біотинільованого DLL4 з низькою концентрацією методом магнітної візуалізації, а потім методом клітинного сортиру з активацією флуоресценції. Потім проводили відбір на більш високі величини констант асоціації, дисоціації або тих і інших, після чого послідовності білків-антитіл клонів A10 з модульованою афінністю регенерували для зворотного перетворення в формат IgG для подальшої характеристики. Області важкого ланцюга (VH) афінно зрілих клонів представлені нижче в таблиці 9, а області легкого ланцюга (VL) афінно зрілих клонів представлені нижче в таблиці 10.

Таблица 9

Варіабельні області важкого ланцюга
(VH) афінно зрілих клонів A10

Область білка		Послідовність	
		123456789012345678901234567890	
A10.3 VH			EVQLVESGGGLVKSGGSLRLSCAASGFTFR SHWMS WVRQAPGKGLEWVA IISYDGSNKYS ADSVKGR FTISRDRSKNTLYLQINSLRAED TAVYYCA KAGGGNVGFDI WGQGTMTVSS (SEQ ID NO:316)
A10.3 VH	CDR-H1	Залишки 31-35 послідовності SEQ ID NO:316	SHWMS
A10.3 VH	CDR-H2	Залишки 50-66 послідовності SEQ ID NO:316	IISYDGSNKYSADSVKG
A10.3 VH	CDR-H3	Залишки 99-108 послідовності SEQ ID NO:316	AGGGNVGFDI
A10.K30 VH			EVQLVESGGGVQPGGSLRLSCAASGFTFG NHWMS WVRQAPGKGLEWVA DISSDGRYKYY ADSVKGR FTISRDRSKNTLYLQINSLRAED TAVYYCA KAGGGNVGFDI WGQGTMTVSS (SEQ ID NO:317)
A10.K30 VH	CDR-H1	Залишки 31-35 послідовності SEQ ID NO:317	NHWMS
A10.K30 VH	CDR-H2	Залишки 50-66 послідовності SEQ ID NO:317	DISSDGRYKYYADSVKG
A10.K30 VH	CDR-H3	Залишки 99-108 послідовності SEQ ID NO:317	AGGGNVGFDI
A10.K42 VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFQ SHWMS WVRQAPGKGLEWVA MISYDGTIKYY ADSVKGR FTISRDRSKNTLYLQINSLRAED TAVYYCA KAGGGNVGFDI WGQGTMTVSS (SEQ ID NO:318)
A10.K42 VH	CDR-H1	Залишки 31-35 послідовності SEQ ID NO:318	SHWMS
A10.K42 VH	CDR-H2	Залишки 50-66 послідовності SEQ ID NO:318	MISYDGTIKYYADSVKG

			123456789012345678901234567890
A10.K42 VH	CDR-H3	Залишки 99-108 послідовності SEQ ID NO:318	AGGGNVGFDI
A10.9A VH			EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFR SYWMS WVRQAPGKGLEWVA TISYDGRNKDY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQLNSLRAED TAVYYCAR AGGGNVGFDI WGQGTMTVSS (SEQ ID NO:319)
A10.9A VH		Залишки 31-35 послідовності SEQ ID NO:319	SYWMS
A10.9A VH		Залишки 50-66 послідовності SEQ ID NO:319	TISYDGRNKDYADSVKG
A10.9A VH		Залишки 99-108 послідовності SEQ ID NO:319	AGGGNVGFDI
A10.8A VH			EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG NHWS WVRQAPGKGLEWVA DISSDGRYKYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQLNSLRAED TAVYYCAR AGGGNVGFDI WGQGTMTVSS (SEQ ID NO:320)
A10.9A VH		Залишки 31-35 послідовності SEQ ID NO:320	NHWS
A10.8A VH		Залишки 50-66 послідовності SEQ ID NO:320	DISSDGRYKYYADSVKG
A10.8A VH		Залишки 99-108 послідовності SEQ ID NO:320	AGGGNVGFDI
A10.1A VH			EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFH SHWMS WVRQAPGKGLEWVA MISDDGRNKDY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQLNSLRAED TAVYYCAR AAGGNVGLDI WGQGTMTVSS (SEQ ID NO:321)
A10.1A VH		Залишки 31-35 послідовності SEQ ID NO:321	SHWMS
A10.1A VH		Залишки 50-66 послідовності SEQ ID NO:321	MISDDGRNKDYADSVKG
A10.1A VH		Залишки 99-108 послідовності SEQ ID NO:321	AAGGNVGLDI
A10.5D VH			EVQLVESGGGVVQSGGSLRLSCAASGFTFG SHWMS WVRQAPGKGLEWVA DISVDGSNKYS ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQNSLRAED TAVYYCAR AAGGNVGLDS WGQGTMTVSS (SEQ ID NO:322)
A10.5D VH		Залишки 31-35 послідовності SEQ ID NO:322	SHWMS
A10.5D VH		Залишки 50-66 послідовності SEQ ID NO:322	DISVDGSNKYSADSVKG

			123456789012345678901234567890
A10.5D VN		Залишки 99-108 послідовності SEQ ID NO:322	AAGGNVGLDS
A10.3A VN			EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG NHWMSWVRQAPGKGLEWVADISSDGRYKYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQINSLRAED TAVYYCAK AAGGNVGFDI WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:323)
A10.3A VN		Залишки 31-35 послідовності SEQ ID NO:323	NHWMS
A10.3A VN		Залишки 50-66 послідовності SEQ ID NO:323	DISSDGRYKYYADSVKG
A10.3A VN		Залишки 99-108 послідовності SEQ ID NO:323	AGGGNVGFDI
A10.6B VN			EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG NHWMSWVRQAPGKGLEWVADISSDGRYKYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQINSLRAED TAVYYCAK AAGGNVGFDI WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:324)
A10.6B VN		Залишки 31-35 послідовності SEQ ID NO:324	NHWMS
A10.6B VN		Залишки 50-66 послідовності SEQ ID NO:324	DISSDGRYKYYADSVKG
A10.6B VN		Залишки 99-108 послідовності SEQ ID NO:324	AGGGNVGFDI
A10.3D VN			EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFR SHWMSWVRQAPGKGLEWVADISQDGSYKYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQINSLRAED TAVYYCAK AAGGNVGFDI WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:325)
A10.3D VN		Залишки 31-35 послідовності SEQ ID NO:325	SHWMS
A10.3D VN		Залишки 50-66 послідовності SEQ ID NO:325	DISQDGSYKYYADSVKG
A10.3D VN		Залишки 99-108 послідовності SEQ ID NO:325	AAGGNVGFDI
A10.4C VN			EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG SHWMSWVRQAPGKGLEWVADISNDGRYAYS ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQINSLRAED TAVYYCAK AAGGNVGFDI WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:326)
A10.4C VN		Залишки 31-35 послідовності SEQ ID NO:326	SHWMS
A10.4C VN		Залишки 50-66 послідовності SEQ ID NO:326	DISNDGRYAYSADSVKG
A10.4C VN		Залишки 99-108 послідовності SEQ ID NO: 326	AGGGNVGFDI

Таблица 10

Варіабельні області легкого ланцюга (VL) афінно зрілих клонів A10

Область білка		Послідовність	
			123456789012345678901234567890
A10.3 VL			SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSADKLGTK YVSWYQQKPGQSPFVLVIYQDAKRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQTMDEADYLCQSW DRSDVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 327)
A10.3 VL	CDR-L1	Залишки 23-33 послідовності SEQ ID NO.: 327	SADKLGTKYVS
A10.3 VL	CDR-L2	Залишки 49-55 послідовності SEQ ID NO.: 327	QDAKRPS
A10.3 VL	CDR-L3	Залишки 88-96 послідовності SEQ ID NO.: 327	QSWDRSDVV
A10.L45 VL			SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSADELGTQ YVSWYQQKPGQSPFVLVIYQDATRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DRSGVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 328)
A10.L45 VL	CDR-L1	Залишки 23-33 послідовності SEQ ID NO.: 328	SADELGTQYVS
A10.L45 VL	CDR-L2	Залишки 49-55 послідовності SEQ ID NO.: 328	QDATRPS
A10.L45 VL	CDR-L3	Залишки 88-96 послідовності SEQ ID NO.: 328	QAWDRSGVV
A10.L73 VL			SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLGSQ YVSWYQQKPGQSPFVLVIYQDAQRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DRSGVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 329)
A10.L73 VL	CDR-L1	Залишки 23-33 послідовності SEQ ID NO.: 329	SGDNLGSQYVS
A10.L73 VL	CDR-L2	Залишки 49-55 послідовності SEQ ID NO.: 329	QDAQRPS
A10.L73 VL	CDR-L3	Залишки 88-96 послідовності SEQ ID NO.: 329	QAWDRSGVV
A10.3A VL			SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSADNLGEK YVSWYQQKPGQSPFVLVIYQDATRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQSW DSSGAVVGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 330)
A10.3A VL	CDR-L1	Залишки 23-33 послідовності SEQ ID NO.: 330	SADNLGEKYVS

			123456789012345678901234567890
A10.3A VL	CDR-L2	Залишки 49-55 послідовності SEQ ID NO.: 330	QDATRPS
A10.3A VL	CDR-L3	Залишки 88-96 послідовності SEQ ID NO.: 330	QSWDSSGAV
A10.6B VL			SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSADNLGNQ YVSWYQQKPGQSPVLVIYQDGNRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DWSGEVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:331)
A10.6B VL	CDR-L1	Залишки 23-33 послідовності SEQ ID NO.: 331	SADNLGNQYVS
A10.6B VL	CDR-L2	Залишки 49-55 послідовності SEQ ID NO.: 331	QDGNRPS
A10.6B VL	CDR-L3	Залишки 88-96 послідовності SEQ ID NO.: 331	QAWDWSGEV
A10.3D VL			SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSADKLGTK YVSWYQQKPGQSPVLVIYQDGNRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQSW DQSGAVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:332)
A10.3D VL	CDR-L1	Залишки 23-33 послідовності SEQ ID NO.: 332	SADKLGTKYVS
A10.3D VL	CDR-L2	Залишки 49-55 послідовності SEQ ID NO.: 332	QDGNRPS
A10.3D VL	CDR-L3	Залишки 88-96 послідовності SEQ ID NO.: 332	QSWDQSGAV
A10.4C VL			SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSADNLGNQ YVSWYQQKPGQSPVLVIYQDGNRPSGIPER FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DSSGAVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:333)
A10.4C VL	CDR-L1	Залишки 23-33 послідовності SEQ ID NO.: 333	SADNLGNQYVS
A10.4C VL	CDR-L2	Залишки 49-55 послідовності SEQ ID NO.: 333	QDGNRPS
A10.4C VL	CDR-L3	Залишки 88-96 послідовності SEQ ID NO.: 333	QAWDSSGAV

Приклад 5: Конструювання CDR-прищеплених антитіл E9

CDR VH E9 приєднували до консенсусної каркасної області VH3 (прищеплені VH=E9vh3g2), а CDR VL E9 приєднували до каркасної області VL2-1 анти-DLL4 антитіла A10 (прищеплені VL=E9a10vlg2) і до каркасної області VK A10 зародкової лінії (найбільш близької за своєю гомологією до VL E9) (прищеплені VL=E9AVK). Альтернативно, репарацію каркасної області (FW) також проводили з використанням VH E9; і ця FW була збережена, але амінокислоти, які можуть викликати нестабільність антитіла, були замінені (репарована VH=E9VH4r2). Зворотні мутації каркасної області вводили в CDR-прищеплену і в FW-репаровану області для збереження структури і функції антитіла (таблиця 11 і таблиця 14).

CDR E9 також приєднували до каркасних областей анти-IL-18 і анти-IL-12 антитіл. Зокрема, CDR VH E9 приєднували до каркасної області VH5-51 анти-IL-18 антитіла (прищеплені VH=E9VH325) і до каркасної області VH2-70 анти-IL-12 антитіла (прищеплені VH=E9VH1D4.1). CDR VL E9 приєднували до каркасної області VK L2/L16 анти-IL-12 (прищеплені VL=E9VL325) і до каркасної області VK B3 анти-IL-12 антитіла (прищеплені VL=E9VL1D4.1). Зворотні мутації каркасної області вводили в CDR-прищеплену область для збереження структури і функції антитіла (таблиця 15 і таблиця 18).

In silico сконструйовані CDR-прищеплені антитіла, описані вище, синтезували безпосередньо у вибрану плазмиду із застосуванням біотехнологічного методу Blue Heron. Варіабельну область

важкого ланцюга вбудовували, із збереженням рамки зчитування, в кДНК-фрагмент, що кодує константну область людського IgG1 дикого типу, і в кДНК-фрагмент, що кодує константну область людського IgG1, що містить дві амінокислотні мутації в шарнірній області. Ці мутації були одержані внаслідок заміни лейцину аланіном в положенні 234 (відповідно до Європейської системи нумерації) і заміни лейцину аланіном 235 (Lund et al., J. Immunol., 147: 2657 (1991)). Варіабельну область легкого ланцюга вбудовували, із збереженням рамки зчитування, в людську константну область лямбда і в людську константну область каппа. Після одержання синтезованих конструкцій методом Blue Heron, ДНК масштабували і підтверджували її послідовність. "Правильно" CDR-прищеплені важкі і легкі ланцюги, відповідні кожному антитілу (таблиці 11 і 14) (таблиці 15 і 18), спільно переносили в клітини HEK-293-6E для короткочасного продукування повнорозмірних CDR-прищеплених анти-DLL4 антитіл. У таблиці 11 систематизовані всі створені варіанти антитіл E9 і дані експресії HEK-293-6e. Клітинні супернатанти, що містять рекомбінантне людське антитіло, були очищені за допомогою хроматографії на білку А-сефарозі, і зв'язане тіло елюювалося при додаванні кислотного буфера. Антитіла діалізували в PBS.

Здатність очищених CDR-прищеплених антитіл зв'язуватися з DLL4 або інгібувати активність DLL4 визначали за допомогою аналізів різних типів, таких як ELISA (Приклад 1.2, метод 2), Біасоре (Приклад 1.2) і проточна цитометрія (FACS) (Приклад 1.3). В таблиці 12 і в таблиці 16 представлені величини EC_{50} , одержані в аналізах ELISA і FACS, і афінності CDR-прищеплених антитіл, визначені методом Біасоре і описані, відповідно, в таблиці 11 і в таблиці 15 для людського DLL4, мишачого DLL4 і DLL4 яванського макака. В таблиці 13 і в таблиці 17 представлені величини IC_{50} , одержані за допомогою ELISA-аналізу на блокування (Приклад 1.4) і аналізу FACS на блокування (Приклад 1.5) людського DLL4 і мишачого DLL4 CDR-прищепленими антитілами, описаними, відповідно, в таблиці 11 і в таблиці 15.

Таблиця 11

Систематизовані дані одержаних і експресованих варіантів антитіла E9

Антитіло	Назва VH	Назва 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

Таблиця 12

Афінності зв'язування варіантів антитіла E9 з людським DLL4, мишачим DLL4 і DLL4 яванського макака, визначені за допомогою ELISA, Біасоре і FACS

Дані зв'язування								
Антитіло	Людський DLL4			Мишачий DLL4			DLL4 яванського макака	
	ELISA на зв'язування (EC_{50} , нМ)	Biacore (Kd, нМ)	FACS на зв'язування (Kd, нМ)	ELISA на зв'язування (EC_{50} , нМ)	Biacore (Kd, нМ)	FACS на зв'язування (Kd, нМ)	ELISA на зв'язування (EC_{50} , нМ)	Biacore (Kd, нМ)
E9-SE1	0,16	15,2*	3,45	0,19	12,83	1,34	0,14	5,42
E9-SE2	0,18	2,43	5,2	0,20	15,09	0,87	0,14	3,68
E9-SE3	0,18	2,26	2,29	0,20	12,1	0,74	0,14	3,42
E9-SE4	0,17	2,38	nc	0,20	10,52	1,15	0,14	3,92
E9-SE5	0,16	1,57	7,81	0,19	12,77	2,9	0,13	6,7
E9-SE6	0,17	0,64	4,25	0,19	10,04	1,18	0,13	6,55
E9-SE7	0,17	1,69	2,28	0,17	16,22	2,24	0,12	7,53
E9-SE8	0,18	2,00	2,67	0,19	13,03	2,32	0,14	3,41

E9.1	0,29	2,38	0,35	0,34	12,77	1,6*	0,24	4,08
------	------	------	------	------	-------	------	------	------

* вже наявні дані; нс = не обчислювали.

Таблиця 13

Нейтралізуюча активність варіантів антитіла E9 відносно людського і мишачого DLL4, визначена за допомогою ELISA і FACS

Функціональні данні				
Антитіло	Людський DLL4		Мишачий DLL4	
	ELISA на блокування (IC ₅₀ , нМ)	FACS на блокування (IC ₅₀ , нМ)	ELISA на блокування (IC ₅₀ , нМ)	FACS на блокування (IC ₅₀ , нМ)
E9-SE1	2,7	8,51	2,9	1,71
E9-SE2	2,6	5,61	2,2	1,23
E9-SE3	2,5	6,75	2,1	1,25
E9-SE4	2,7	5,82	2,9	1,71
E9-SE5	2,6	6,38	2,4	1,76
E9-SE6	2,5	8,16	2,9	1,53
E9-SE7	2,4	7,81	2,4	1,94
E9-SE8	2,5	9,25	2,6	2,3
E9.1	2,5	4,55	2,5	1,02

Таблиця 14

Амінокислотні послідовності VH і VL людських CDR-прищеплених антитіл E9

SEQ ID No.	Область білка		Послідовність
			123456789012345678901234567890
334	VH E9.1		EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SSSYTWGWIRQPPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRVTISVDTSKNQPSLKLSSTVTA DTAVYYCAREDEVILRGGS DYWGQGT LVTVS S
	VH E9.1 CDR-H1	Залишки 31-37 послідовності SEQ ID NO.: 334	SSSYTWG
	VH E9.1 CDR-H2	Залишки 52-67 послідовності SEQ ID NO.: 334	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9.1 CDR-H3	Залишки 100-110 послідовності SEQ ID NO.: 334	EDVILRGGS DY
			123456789012345678901234567890
335	VL E9.1		SYELTQEPFVSVPQTASITCSGQRLGDK YASWTQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPER FSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAW DRDTGVFGYGRVTVLG
	VL E9.1 CDR-L1	Залишки 23-33 послідовності SEQ ID NO.: 335	SGQRLGDKYAS
	VL E9.1 CDR-L2	Залишки 49-55 послідовності SEQ ID NO.: 335	EDSKRPS
	VL E9.1 CDR-L3	Залишки 88-96 послідовності SEQ ID NO.: 335	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890
336	VH E9-SE1		EVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAVSGGSIS SSSYTWGWIRQAPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRVTISVDTSKNSFYIQMNSLP AE DTAVYYCAREDEVILRGGS DYWGQGT LVTVS S
	VH E9-SE1 CDR-H1	Залишки 31-37 послідовності SEQ ID NO.: 336	SSSYTWG
	VH E9-SE1 CDR-H2	Залишки 52-67 послідовності SEQ ID NO.: 336	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-SE1 CDR-H3	Залишки 100-110 послідовності SEQ ID NO.: 336	EDVILRGGS DY
			123456789012345678901234567890
337	VL E9-SE1		LYVLTQEPFVSVPQTASITCSGQRLGDK YASWTQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPER FSGSNSGDTATLTISGTQTMDEADYLCQAW DRDTGVFGGGTKVTVLG

			123456789012345678901234567890
	VL E9-SE1 CDR-L1	Залишки 23-33 послідовності SEQ ID NO.: 337	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE1 CDR-L2	Залишки 49-55 послідовності SEQ ID NO.: 337	EDSKRPS
	VL E9-SE1 CDR-L3	Залишки 88-96 послідовності SEQ ID NO.: 337	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890
336	VH E9-SE2		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGGSIS SSSYIWGMIRQAPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRVTISVDTSKNSFYLMNLSRAE DTAVYYCAREDEVILRGGSQYWGQGTLVTVS S
	VH E9-SE2 CDR-H1	Залишки 31-37 послідовності SEQ ID NO.: 338	SSSYIWG
	VH E9-SE2 CDR-H2	Залишки 52-67 послідовності SEQ ID NO.: 338	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-SE2 CDR-H3	Залишки 100-110 послідовності SEQ ID NO.: 338	EDVILRGGSQY
			123456789012345678901234567890
339	VL E9-SE2		SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDK YASWYQQKPGQSPVLIYEDSKRPSGIPER FSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAW DRDTGVVFGYGRVTVLG
	VL E9-SE2 CDR-L1	Залишки 23-33 послідовності SEQ ID NO.: 339	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE2 CDR-L2	Залишки 49-55 послідовності SEQ ID NO.: 339	EDSKRPS
	VL E9-SE2 CDR-L3	Залишки 88-96 послідовності SEQ ID NO.: 339	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890
340	VH E9-SE3		EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCITVSGGSIS SSSYIWGMIRQAPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRVTISVDTSKNQFYLLKLSVRAE DTAVYYCAREDEVILRGGSQYWGQGTLVTVS S
	VH E9-SE3 CDR-H1	Залишки 31-37 послідовності SEQ ID NO.: 340	SSSYIWG
	VH E9-SE3 CDR-H2	Залишки 52-67 послідовності SEQ ID NO.: 340	DIYYTGSTYYNPSLKS

			123456789012345678901234567890
	VH E9-SE3 CDR-H3	Залишки 100-110 послідовності SEQ ID NO.: 340	EDVILRGGSDY
			123456789012345678901234567890
341	VL E9-SE3		SYELTQPFSSVSVPQTASITCSGQRLGDK YASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPER FSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAW DRDTGVFGYGPRTVTLG
	VL E9-SE3 CDR-L1	Залишки 23-33 послідовності SEQ ID NO.: 341	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE3 CDR-L2	Залишки 49-55 послідовності SEQ ID NO.: 341	EDSKRPS
	VL E9-SE3 CDR-L3	Залишки 88-98 послідовності SEQ ID NO.: 341	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890
342	VH E9-SE4		EVQLQESGGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SSSYIYWGNIHQPPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAREDEVILRGGSDYWGQGTLVTS S
	VH E9-SE4 CDR-H1	Залишки 31-37 послідовності SEQ ID NO.: 342	SSSYIYWG
	VH E9-SE4 CDR-H2	Залишки 52-67 послідовності SEQ ID NO.: 342	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-SE4 CDR-H3	Залишки 100-110 послідовності SEQ ID NO.: 342	EDVILRGGSDY
			123456789012345678901234567890
343	VL E9-SE4		LYVLTQPPSSVSVPQTASITCSGQRLGDK YASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPER FSGSNSGDTATLTISGTQTMDEADYLCQAW DRDTGVFGSGTKVTVLG
	VL E9-SE4 CDR-L1	Залишки 23-33 послідовності SEQ ID NO.: 343	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE4 CDR-L2	Залишки 49-55 послідовності SEQ ID NO.: 343	EDSKRPS
	VL E9-SE4 CDR-L3	Залишки 88-98 послідовності SEQ ID NO.: 343	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890

			123456789012345678901234567890
344	VH E9-SE5		EVQLQESGGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS SSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSEVTISVDTSKNQFSLKLSVTA DTAVYYCAREDVILRGGSDYWGQGLTVTS S
	VH E9-SE5 CDR-H1	Залишки 31-37 послідовності SEQ ID NO.: 344	SSSYWGW
	VH E9-SE5 CDR-H2	Залишки 52-67 послідовності SEQ ID NO.: 344	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-SE5 CDR-H3	Залишки 100-110 послідовності SEQ ID NO.: 344	EDVILRGGSDY
345	VL E9-SE5		123456789012345678901234567890
	VL E9-SE5 CDR-L1	Залишки 24-34 послідовності SEQ ID NO.: 345	EYVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSGQRLGD KYASWYQQKPKQSPKLVITYEDSKRPSGVPS RFGSGNSGDDATLTINSLEAEDAATYYCQA WDRDTGVVFGQGTKVEIKR
	VL E9-SE5 CDR-L2	Залишки 50-56 послідовності SEQ ID NO.: 345	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE5 CDR-L3	Залишки 89-97 послідовності SEQ ID NO.: 345	EDSKRPS
	VL E9-SE5 CDR-L3	Залишки 89-97 послідовності SEQ ID NO.: 345	QAWDRDTGV
346	VH E9-SE6		123456789012345678901234567890
	VH E9-SE6 CDR-H1	Залишки 31-37 послідовності SEQ ID NO.: 346	EVQLQESGGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSIS SSSYWGWIRQAPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSEVTISVDTSKNQFYLKLSVPAE DTAVYYCAREDVILRGGSDYWGQGLTVTS S
	VH E9-SE6 CDR-H2	Залишки 52-67 послідовності SEQ ID NO.: 346	SSSYWGW
	VH E9-SE6 CDR-H3	Залишки 100-110 послідовності SEQ ID NO.: 346	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-SE6 CDR-H3	Залишки 100-110 послідовності SEQ ID NO.: 346	EDVILRGGSDY
347	VL E9-SE6		123456789012345678901234567890
	VL E9-SE6 CDR-L1	Залишки 24-34 послідовності SEQ ID NO.: 347	LYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDK YASWYQQKPGQSPVLVITYEDSKRPSGIPER FSGNSGDTATLTISGTQTMDEADYLCQAW DRDTGVVFGGGTKVTVLG

			123456789012345678901234567890
	VL E9-SE6 CDR-L1	Залишки 23-33 послідовності SEQ ID NO.: 347	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE6 CDR-L2	Залишки 48-55 послідовності SEQ ID NO.: 347	EDSKRPS
	VL E9-SE6 CDR-L3	Залишки 88-96 послідовності SEQ ID NO.: 347	QAWDRDTGV
348	VH E9-SE7		EVQLVESGGGLVQPGGSLPLSCAVSGGSIS SSSYWGWIRQAPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRVTISVDTSKNSTYLGQMSLRAE DTAVYYCAREDVILRGGSDYWGQSTLVTVS S
	VH E9-SE7 CDR-H1	Залишки 31-37 послідовності SEQ ID NO.: 348	SSSYWGW
	VH E9-SE7 CDR-H2	Залишки 52-67 послідовності SEQ ID NO.: 348	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-SE7 CDR-H3	Залишки 100-110 послідовності SEQ ID NO.: 348	EDVILRGGSDY
349	VL E9-SE7		123456789012345678901234567890 EVVLTQSPDFQSVTPKERVITCSGQRLGD KYASWYQOKPDQSPKLVIIYEDSKRPSGVPS RFGGSNSGDDATLTINSLEAEDAATYYCQA WDRDTGVVFGQGTKVEIKR
	VL E9-SE7 CDR-L1	Залишки 24-34 послідовності SEQ ID NO.: 349	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE7 CDR-L2	Залишки 50-56 послідовності SEQ ID NO.: 349	EDSKRPS
	VL E9-SE7 CDR-L3	Залишки 89-97 послідовності SEQ ID NO.: 349	QAWDRDTGV
350	VH E9-SE8		123456789012345678901234567890 EVQLQESGPGLVKPGETLSLTCTVSGGSIS SSSYWGWIRQAPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRVTISVDTSKNQFYKLSSVRAE DTAVYYCAREDVILRGGSDYWGQSTLVTVS S
	VH E9-SE8 CDR-H1	Залишки 31-37 послідовності SEQ ID NO.: 350	SSSYWGW
	VH E9-SE8 CDR-H2	Залишки 52-67 послідовності SEQ ID NO.: 350	DIYYTGSTYYNPSLKS

			123456789012345678901234567890
	VH E9-SE8 CDR-H3	Залишки 100-110 послідовності SEQ ID NO.: 350	EDVILRGGS DY
351	VL E9-SE8		123456789012345678901234567890 EXVLTQSFDFG8VTPEKVTITCSGQRLGD KYASWTQQKPDQSPMLVIYEDSKRPSGVPS RFSQSN9GDDATLTINSLEAEDAATYYCQA WDRDRTGVFCQGTVEIKR
	VL E9-SE8 CDR-L1	Залишки 24-34 послідовності SEQ ID NO.: 351	SGQRLGDKYAS
	VL E9-SE8 CDR-L2	Залишки 50-56 послідовності SEQ ID NO.: 351	EDSKRPS
	VL E9-SE8 CDR-L3	Залишки 89-97 послідовності SEQ ID NO.: 351	QAWDRDRTGV

Систематизовані дані одержаних і експресованих варіантів антитіла E9

Антитіло	Назва VH	Назва VL	Титр HEK-293-6е (мг/л)
E9-FR1	E9VH325	E9VL325	29
E9-FR2	E9VH1D4.1	E9VL1D4.1	44

Таблиця 15

Систематизовані дані одержаних і експресованих варіантів антитіла E9

Антитіло	Назва VH	Назва VL	Титр HEK-293-6е (мг/л)
E9-FR1	E9VH325	E9VL325	29
E9-FR2	E9VH1D4.1	E9VL1D4.1	44

Таблиця 16

Афінності зв'язування CDR-прищеплених антитіл E9 з людським DLL4, мишачим DLL4 і DLL4 яванського макака, визначені за допомогою ELISA, Biacore і FACS

Дані зв'язування								
	Людський DLL4			Мишачий DLL4			DLL4 яванського макака	
MAb	ELISA на зв'язування (EC ₅₀ , нМ)	Biacore (Kd, нМ)	FACS на зв'язування (Kd, нМ)	ELISA на зв'язування (EC ₅₀ , нМ)	Biacore (Kd, нМ)	FACS на зв'язування (Kd, нМ)	ELISA на зв'язування (EC ₅₀ , нМ)	Biacore (Kd, нМ)
E9-FR1	0,11	0,72	4	0,13	1,6	2,51	0,12	0,74
E9-FR2	0,105	0,31	6,2	0,125	0,69	3,57	0,12	0,3
E9.1	0,03	0,52	3,62	0,04	1,1	1,66	0,035	0,47

Таблиця 17

Нейтралізуюча активність CDR-прищеплених антитіл E9 відносно людського і мишачого DLL4, визначена за допомогою ELISA і FACS

Функціональні данні				
	Людський DLL4		Мишачий DLL4	
MAb	ELISA на	FACS на	ELISA на	FACS на

	блокування (IC ₅₀ , нМ)	блокування (IC ₅₀ , нМ)	блокування (IC ₅₀ , нМ)	блокування (IC ₅₀ , 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

Таблиця 18

Амінокислотні послідовності VH і VL людських CDR-прищеплених антиті.

SEQ ID No.	Область білка		Послідовність
			123456789012345678901234567890
352	VH E9-FR1		EVQLVQSGTEVKKPKGESLKISCKVSGGRIS SSSYIYWGWIROPKPGKLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSQVTISVDTSFNTFFLOWSSLKAS DTAMYYCAPEDVILRGGSDYWGQGTMTVTS S
	VH E9-FR1 CDR-H1	Залишки 31-37 послідовності SEQ ID NO.: 352	SSSYIYWG
	VH E9-FR1 CDR-H2	Залишки 52-67 послідовності SEQ ID NO.: 352	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-FR1 CDR-H3	Залишки 100-110 послідовності SEQ ID NO.: 352	EDVILRGGSDY
			123456789012345678901234567890
353	VL E9-FR1		EYVLTQSPFATLSVSPGERATLSCSGQRLGD KYASWYQQKPGQSPRLVIYEDSKRPSDIPA RFGSGNSGDEATLTISSLQSEDFAVYYCQA WDRDTGVFGGTTRLEIKR
	VL E9-FR1 CDR-L1	Залишки 24-34 послідовності SEQ ID NO.: 353	SGQRLGDKYAS
	VL E9-FR1 CDR-L2	Залишки 50-56 послідовності SEQ ID NO.: 353	EDSKRPS
	VL E9-FR1 CDR-L3	Залишки 88-97 послідовності SEQ ID NO.: 353	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890
354	VH E9-FR2		EYVLTQSPFATLSVSPGERATLSCSGQRLGD SSSYIYWGWIROPKPGKLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSQVTISVDTSKNQFVLTMTNMDPV DTATYYCAPEDVILRGGSDYWGQGTMTVTS S
	VH E9-FR2 CDR-H1	Залишки 31-37 послідовності SEQ ID NO.: 354	SSSYIYWG
	VH E9-FR2 CDR-H2	Залишки 52-67 послідовності SEQ ID NO.: 354	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9-FR2 CDR-H3	Залишки 100-110 послідовності SEQ ID NO.: 354	EDVILRGGSDY
			123456789012345678901234567890
355	VL E9-FR2		DYVLTQSPDSLVSLGERATINCSGQRLGD KYASWYQQKPGQSPKLVITYEDSKRPSGIPD RFGSGNSGDDATLTISSLQAEDVAVYYCQA WDRDTGVFGGTTRVEIKR

			123456789012345678901234567890
	VL E9-FR2 CDR-L1	Залишки 24-34 послідовності SEQ ID NO.: 355	SGQRLGDKYAS
	VL E9-FR2 CDR-L2	Залишки 50-56 послідовності SEQ ID NO.: 355	EDSKRPS
	VL E9-FR2 CDR-L3	Залишки 89-97 послідовності SEQ ID NO.: 355	QAWDRDTGV

**Приклад 6: Подальше конструювання афінно зрілого антитіла E9-71
E9-71(M) і E9-71(L)**

Було проведено подальше конструювання важкого і легкого ланцюгів афінно зрілого анти-DLL4 антитіла E9-71. Метіонін (M) в CDR-H3 важкого ланцюга E9-71 замінювали лейцином (L) шляхом конструювання прямих і зворотних праймерів, що перекриваються, які містять мутовані нуклеотиди. Потім проводили послідовну двостадійну полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) для ампліфікації повнорозмірного гена варіабельної області з використанням двох праймерів, що несуть мутовані нуклеотиди, і двох найбільш крайніх праймерів, що містять виступаючі послідовності, комплементарні одержаному вектору.

Сигнальний пептид, використовуваний для легкого ланцюга E9-71 (M) і E9-71 (L), називається сигнальним пептидом лямбда 1a. Каркасну область 4 (FW4) hJL-1 легкого ланцюга E9-71 замінювали областю hJL2 для надання їй більшої сумісності з константною областю huCL2 антитіла. Потім конструювали прямі і зворотні праймери, що містять мутовані нуклеотиди. Потім проводили послідовну двостадійну полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) для ампліфікації повнорозмірного гена варіабельної області з використанням двох праймерів, що несуть мутовані нуклеотиди, і двох найбільш крайніх праймерів, що містять виступаючі послідовності, комплементарні одержаному вектору.

ПЛР-продукти, одержані після проведення кожного збирання кДНК, розділяли на агарозному гелі, і смугу, відповідну передбаченій кДНК варіабельної області, вирізали по розміру і очищали. Варіабельну область важкого ланцюга вбудовували, із збереженням рамки зчитування, в кДНК-фрагмент, що кодує константну область людського IgG1, яка містить дві амінокислотні мутації в шарнірній області, шляхом гомологічної рекомбінації в бактеріях. Такими мутаціями є заміна лейцину аланіном в положенні 234 (відповідно до Європейської системи нумерації) і заміна лейцину аланіном в положенні 235 (Lund et al., J. Immunol, 147: 2657 (1991)). Варіабельну область легкого ланцюга вбудовували, із збереженням рамки зчитування, між людським сигнальним пептидом лямбда 1a і людською константною областю лямбда за допомогою гомологічної рекомбінації. Бактеріальні колонії виділяли, плазмідну ДНК екстрагували і кДНК-вставку секвенували кДНК по всій довжині. "Правильні" важкі і легкі ланцюги, відповідні кожному антитілу (таблиця 19), спільно переносили в клітини HEK-293-6E для короточасного продукування повнорозмірних антитіл проти людського DLL4, E9-71(M) або E9-71(L). Обидва ці антитіла E9.71(M) і E9.71(L) мали один і той же легкий ланцюг. Клітинні супернатанти, що містять рекомбінантне людське антитіло, були очищені за допомогою хроматографії на білку А-сефарозі і зв'язане тіло елюювалося при додаванні кислотного буфера. Антитіла нейтралізували і діалізували в PBS.

Таблиця 19

**Амінокислотні послідовності VH і VL людських сконструйованих
антитіл E9.71**

SEQ ID No.	Область білка		Послідовність
			123456789012345678901234567890
356	VH E9.71		EVQLQSSGGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SSSYWGWIRQPPGKLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAA DTAVYYCAPQALAMGGGSDKRGQSTLVTVS S
	VH E9.71 CDR-H1	Залишки 31-37 послідовності SEQ ID NO.: 356	SSSYWGW
	VH E9.71 CDR-H2	Залишки 52-67 послідовності SEQ ID NO.: 356	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9.71 CDR-H3	Залишки 100-110 послідовності SEQ ID NO.: 356	QALAMGGGSDK
			123456789012345678901234567890
357	VL E9.71		SYELTQFPSPVSPGQTASITCSGQRLGDK YASWYQQKPKQSPVLVIYEDSKRPSGIPER FQCSNNGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAW DRDTGVFGYGTKEVVLG
	VL E9.71 CDR-L1	Залишки 23-33 послідовності SEQ ID NO.: 357	SGQRLGDKYAS
	VL E9.71 CDR-L2	Залишки 49-55 послідовності SEQ ID NO.: 357	EDSKRPS
	VL E9.71 CDR-L3	Залишки 88-96 послідовності SEQ ID NO.: 357	QAWDRDTGV
			123456789012345678901234567890
358	VH E9.71 (M)		EVQLQSSGGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS SSSYWGWIRQPPGKLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAA DTAVYYCAPQALAMGGGSDKRGQSTLVTVS S
	VH E9.71 (M) CDR-H1	Залишки 31-37 послідовності SEQ ID NO.: 358	SSSYWGW
	VH E9.71 (M) CDR-H2	Залишки 52-67 послідовності SEQ ID NO.: 358	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9.71 (M) CDR-H3	Залишки 100-110 послідовності SEQ ID NO.: 358	QALAMGGGSDK
			123456789012345678901234567890

			123456789012345678901234567890
359	VL E9.71 (M)		SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDK YASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPER FSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAW DRDTGVFGGGTKLTVLG
	VL E9.71 (M) CDR-L1	Залишки 23-33 послідовності SEQ ID NO.: 359	SGQRLGDKYAS
	VL E9.71 (M) CDR-L2	Залишки 49-55 послідовності SEQ ID NO.: 359	EDSKRPS
	VL E9.71 (M) CDR-L3	Залишки 88-96 послідовності SEQ ID NO.: 359	QAWDRDTGV
360	VH E9.71 (L)		123456789012345678901234567890 EVQLQESGGGLVQPGSETLSLTCTVSQGSIS SSSYWGWIRQPPGKGLEWIGDIYYTGSTY YNPSLKSRTISVDTSENQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAEQALALGGGSDKNGQGTLVTVS S
	VH E9.71 (L) CDR-H1	Залишки 31-37 послідовності SEQ ID NO.: 360	SSSYWGW
	VH E9.71 (L) CDR-H2	Залишки 52-67 послідовності SEQ ID NO.: 360	DIYYTGSTYYNPSLKS
	VH E9.71 (L) CDR-H3	Залишки 100-110 послідовності SEQ ID NO.: 360	QALALGGGSDK
361	VL E9.71 (L)		123456789012345678901234567890 SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGQRLGDK YASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPER FSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYCQAW DRDTGVFGGGTKLTVLG
	VL E9.71 (L) CDR-L1	Залишки 23-33 послідовності SEQ ID NO.: 361	SGQRLGDKYAS
	VL E9.71 (L) CDR-L2	Залишки 49-55 послідовності SEQ ID NO.: 361	EDSKRPS
	VL E9.71 (L) CDR-L3	Залишки 88-96 послідовності SEQ ID NO.: 361	QAWDRDTGV

Приклад 7: Конструювання сигнального пептиду E9-71(M)

Для генерування анти-DLL4 антитіла E9-71(M) використовували сигнальний пептид лямбда 1a. Були також досліджені альтернативні сигнальні пептиди. Передбачувані дані відносно процента "правильного" розщеплення антитіла в процесі експресії in silico сконструйованих амінокислотних послідовностей N-кінцевої варіабельної області E9-71(M) з різними сигнальними пептидами, що походять від сімейства сигнальних пептидів лямбда і каппа, можуть бути знайдені в Інтернеті за допомогою сервера Signal IP 3.0 (наприклад, на web-сайті cbs.dtu.dk/services/SignalP/) або з використанням інших еквівалентних комп'ютерних програм. Були вибрані сигнальні пептиди, передбачувано, з найбільш високим процентом "правильного" відщеплення, по одному від кожного сімейства: пептид лямбда 3p, що належить до сімейства лямбда, і пептид L23, що належить до сімейства каппа. Був також вибраний мутований варіант, що походить від вихідного сигнального пептиду лямбда 1a, з двома амінокислотними замінами (гліцину на аргінін і серину на валін). Для конструювання легкого ланцюга, що містить сигнальний пептид лямбда 1a, здійснювали одностадійну полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) для ампліфікації повнорозмірного гена варіабельної області з використанням двох найбільш крайніх праймерів, що містять виступаючі послідовності, комплементарні "приймаючому" вектору, де один з них містить мутовану нуклеотидну послідовність. Для одержання легкого ланцюга, що містить сигнальний пептид лямбда 3p і сигнальний пептид каппа L23, були створені два праймери, що перекриваються, з метою конструювання області сигнального пептиду, а потім була проведена полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) для ампліфікації повнорозмірного гена варіабельної області з використанням двох найбільш крайніх праймерів, що містять виступаючі послідовності, комплементарні "приймаючому" вектору. З використанням

сигнальних пептидів лямбда 3p і каппа L23 були одержані два варіанти варіабельних областей E9-71, де один з них мав повнорозмірну варіабельну область, а інший - варіабельну область, в якій був відсутній перший серин (S) біля N-кінця. Сигнальний пептид лямбда 1a був присутнім тільки в сконструйованій повнорозмірній варіабельній області. ПЛР-продукти, одержані після кожного збирання кДНК, розділяли на агарозному гелі, і смугу, розмір якої відповідав передбаченій кДНК варіабельної області, вирізали і очищали. Варіабельну область важкого ланцюга вбудовували із збереженням рамки зчитування в кДНК-фрагмент, що кодує константну область людського IgG1, що містить дві амінокислотних мутації в шарнірній області, шляхом гомологічної рекомбінації в бактеріях. Такими мутаціями є заміна лейцину аланіном в положенні 234 (відповідно до Європейської системи нумерації) і заміна лейцину аланіном в положенні 235 (Lund et al., J. Immunol, 147: 2657 (1991)). Варіабельну область легкого ланцюга з людською константною областю лямбда вбудовували, із збереженням рамки зчитування, за допомогою гомологічної рекомбінації. Бактеріальні колонії виділяли, плазмідну ДНК екстрагували, і кДНК-вставку секвенували по всій її довжині. "Правильні" важкі і легкі ланцюги, відповідні кожному антитілу (таблиця 19), спільно переносили в клітини HEK-293-6E для короточасного продукування повнорозмірних антитіл проти людського DLL4, E9-71(M). Клітинні супернатанти, що містять рекомбінантне людське антитіло, очищали за допомогою хроматографії на білку А-сефарозі і зв'язане антитіло елюювалося при додаванні кислотного буфера. Антитіла діалізували в PBS. Очищене антитіло E9.71(M) аналізували за допомогою мас-спектрометрії (МС) для підтвердження послідовності інтактного антитіла. У таблиці 20, наведеній нижче, представлені амінокислотні послідовності різних сигнальних пептидів, використовуваних для одержання антитіла E9.71(M). У таблиці 21, наведеній нижче, представлені сайти розщеплення антитіла E9.71(M), проаналізовані за допомогою мас-спектрометрії.

Таблиця 20

Амінокислотні послідовності сигнальних пептидів,
використовуваних для конструювання E9.71(M)

Антитіло	Сигнальний пептид	Послідовність сигнального пептида	Повнорозмірність
E9.71(M)	λ 1a	MAWSPLFLTLITHCAGSWA (SEQ ID NO:362)	N-кінцевий S-відсутній
E9.71(M)-1	λ 1a (GS to RV)	MAWSPLFLTLITHCARVWA (SEQ ID NO:363)	Повнорозмірна Повнорозмірна
E9.71(M)-2	λ 3p	MAWTPLLLPLLTFCVSEA (SEQ ID NO:364)	Повнорозмірна
E9.71(M)-3	λ 3p	MAWTPLLLPLLTFCVSEA (SEQ ID NO:365)	N-кінцевий S-відсутній
E9.71(M)-4	Каппа L23	MDMRVPAQRLGLLLLWFPGARC (SEQ ID NO:366)	Повнорозмірна
E9.71(M)-5	Каппа L23	MDMRVPAQRLGLLLLWFPGARC (SEQ ID NO:367)	N-кінцевий S-відсутній

Таблиця 21

Сайти розщеплення антитіла E9.71(M),
проаналізовані за допомогою мас-спектрометрії (МС)

Антитіло	Головний сайт розщеплення антитіла	% головного піка з (1)
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	MAWTPLLLPLLTFCVSEA↓SYELTQPPSVS (SEQ ID NO:370)	96
E9.71(M)-3	MAWTPLLLPLLTFCVSEA↓YELTQPPSVS (SEQ ID NO:371)	97
E9.71(M)-4	MDMRVPAQRLGLLLLWFPGARCL↓SYELTQPPSVS (SEQ ID NO:372)	Не визначали
E9.71(M)-5	MDMRVPAQRLGLLLLWFPGARCL↓YELTQPPSVS (SEQ ID NO:373)	Не визначали

Приклад 8: Характеризація in vitro сконструйованих антитіл PROfusion

Афінність зв'язування сконструйованих антитіл PROfusion з антигеном визначали із застосуванням BIACORE-технології, як описано в прикладі 1.1., і ці дані представлені нижче в таблиці 22. In vitro активність репрезентативних антитіл також оцінювали іншими методами, описаними в прикладі 1, і результати такої оцінки представлені в таблиці 23.

Таблиця 22

Кінетика зв'язування сконструйованих анти-DLL4 антитіл PROfusion, оцінювана методом Biacore

Антитіло	Кінетика зв'язування								
	ECD людського DLL4			ECD мишачого DLL4			ECD DLL4яванського макака		
	K_a ($M^{-1}s^{-1}$) E+04	K_d (s^{-1}) E-05	K_D (нМ)	K_a ($M^{-1}s^{-1}$) E+04	K_d (s^{-1}) E-05	K_D (нМ)	K_a ($M^{-1}s^{-1}$) E+04	K_d (s^{-1}) E-05	K_D (нМ)
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
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
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
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
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
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
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
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 = моноклональне антитіло; N/D = не визначали; NB = не зв'язується.

Таблиця 23

Характеризація відібраного сконструйованого анти-DLL4 антитіла PROfusion

	Аналізи на пряме зв'язування					Аналізи на функціональне блокування					
Антитіло	ELISA з захопленням (EC ₅₀ , нМ)			FACS (EC ₅₀ , нМ)		ELISA на конкурентне зв'язування (IC ₅₀ , нМ)			FACS на конкурентне зв'язування (IC ₅₀ , нМ)		Інгібування активації Notch в співкультурі huDLL4-клітин (IC ₅₀ , нМ)
	ECD DLL4			DLL4-клітини		ECDDL4/huNotch-1			huNotch-1/DLL4-клітини		
	hu	mu	супо	hu	mu	hu	mu	супо	hu	mu	
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
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	N/D	9,12	1,3	N/D
E9-66	N/D	N/D	N/D	2,02	0,7	N/D	N/D	N/D	5,03	0,99	N/D
E9-IF	N/D	N/D	N/D	2,65	0,37	N/D	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	N/D	3,76	0,34	N/D
E9-7E	N/D	N/D	N/D	4,46	1,94	N/D	N/D	N/D	4	0,33	0,41
E9-10C	N/D	N/D	N/D	3,15	0,88	N/D	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	N/D	3,83	0,36	N/D
E9-10H	N/D	N/D	N/D	3,52	0,82	N/D	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	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	N/D	2,12	0,18	N/D
E9-71(L)	N/D	N/D	N/D	0,22	0,47	N/D	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	N/D	0,65

hu = людські; mu = мишачі; суро = яванського макака; N/D = не визначали.

Приклад 9: Фізико-хімічні властивості вибраних антитіл PROfusion

Ідентичність моноклональних антитіл, специфічних до DLL4, визначали за допомогою мас-спектрометрії, описаної нижче.

Мас-спектрометричний аналіз E9-71

Аналіз молекулярної маси легкого ланцюга і важкого ланцюга: Зразок E9-71 розводили до 1 мг/мл шляхом додавання води Milli-Q. До 20 мкл розведеного зразка додавали 1 мкл 1M DTT. Зразок інкубували при 37 °C протягом 30 хвилин. 1 мкл відновлених зразків впорскували в PX/MC-систему Agilent 6510 Q-TOF, забезпечену упакованою дифенілом колонкою Varian Diphenyl. Буфер А являє собою 0,02 % трифтороцтову кислоту (TFA), 0,08 % мурашину кислоту (FA) у воді. Буфер В являє собою 0,02 % TFA, 0,08 % FA в ацетонітрилі. Вихідний градієнт становив 5 % В, а потім його збільшували до 35 % В за 5 хвилин і до 38 % В за 15 хвилин. Після цього градієнт збільшували до 95 % В за 1 хвилину і втримували при 95 % В протягом 4 хвилин, а потім знижували до 5 % В за 1 хвилину. Швидкість потоку становила 50 мкл/хв. Мас-спектрометр працював при напрузі розпилення 5 кВ, а інтервали сканування становили 600:3200 (відношення маса:заряд). Молекулярна маса легкого ланцюга 22649 дальтон чітко відповідає теоретичній величині для легкого ланцюга, де біля N-кінця присутня амінокислота Y. Три невеликих піки спостерігалися при молекулярній масі 22014 дальтон, 22737 дальтон і 22937 дальтон. Пік при 22014 дальтон відповідав N-кінцевому фрагменту, що складається з 6 амінокислот. Цей пік, ймовірно, виник внаслідок фрагментації повнорозмірного легкого ланцюга в іонному джерелі, оскільки зниження "величини фрагмента" в мас-спектрометрі приводило до зникнення цього піка. Пік при 22737 дальтон відповідав теоретичній величині для легкого ланцюга з амінокислотою S, присутньою біля N-кінця. Пік при 22937 дальтон відповідав легкому ланцюгу з сигнальним пептидом, подовженим на амінокислоти "LS" на N-кінці. Молекулярні маси важкого ланцюга добре відповідали теоретичним величинам. Спостережувані молекулярні маси становили 50263 дальтон, 50426 дальтон і 50588 дальтон, де різниця в 162 дальтон є результатом відмінності в глікозилюванні.

Мас-спектрометричний аналіз E9-71(M)

Метод, описаний в розділі "Мас-спектрометричний аналіз E9-71", був використаний для аналізу зразка E9-71(M). Молекулярна маса легкого ланцюга, що дорівнює 22645 дальтон, добре відповідала теоретичній величині, одержаній для легкого ланцюга з амінокислотою S, присутньою біля N-кінця. Невеликий пік, спостережуваний для молекулярної маси 22989 дальтон, відповідав легкому ланцюгу з сигнальним пептидом, подовженим на амінокислоти "SWA" біля N-кінця. Спостерігався також дуже невеликий пік з молекулярною масою 21923 дальтон, хоч, ймовірно, він виник внаслідок фрагментації повнорозмірного легкого ланцюга в іонному джерелі, оскільки зниження "величини фрагмента" в мас-спектрометрі приводило до зникнення цього піка. Молекулярні маси важкого ланцюга добре відповідали теоретичним величинам. Спостережувані молекулярні маси становили 50263 дальтон, 50426 дальтон і 50588 дальтон, де різниця в 162 дальтон є результатом відмінності в глікозилюванні.

Мас-спектрометричний аналіз E9-71(L)

Метод, описаний в розділі "Мас-спектрометричний аналіз E9-71", був використаний для аналізу зразка E9-71(L). Молекулярна маса легкого ланцюга, що дорівнює 22645 дальтон, добре відповідала теоретичній величині, одержаній для легкого ланцюга з амінокислотою S, присутньою біля N-кінця. Невеликий пік, спостережуваний для молекулярної маси 22989 дальтон, відповідав легкому ланцюгу з сигнальним пептидом, подовженим на амінокислоти "SWA" біля N-кінця. Спостерігався також дуже невеликий пік з молекулярною масою 21923 дальтон, хоч, ймовірно, він виник внаслідок фрагментації повнорозмірного легкого ланцюга в іонному джерелі, оскільки зниження "величини фрагмента" в мас-

спектрометрії приводило до зникнення цього піка. Молекулярні маси важкого ланцюга добре відповідали теоретичним величинам. Спостережувані молекулярні маси становили 50245 дальтон, 50407 дальтон і 50569 дальтон, де різниця в 162 дальтон є результатом відмінності в глікозилюванні.

Мас-спектрометричний аналіз E9-71(M)-3

Метод, описаний в розділі "Мас-спектрометричний аналіз E9-71", був використаний для аналізу зразка E9-71(M)-3. Молекулярна маса легкого ланцюга, що дорівнює 22558 дальтон, добре відповідала теоретичній величині. Спостерігався також дуже невеликий пік з молекулярною масою 21923 дальтон, хоч, ймовірно, він виник внаслідок фрагментації повнорозмірного легкого ланцюга в іонному джерелі, оскільки зниження "величини фрагмента" в мас-спектрометрії приводило до зникнення цього піка. Спостережувані молекулярні маси важкого ланцюга добре відповідали теоретичним величинам. Спостережувані молекулярні маси становили 50263 дальтон, 50426 дальтон і 50588 дальтон, де різниця в 162 дальтон є результатом відмінності в глікозилюванні.

Розчинність антитіл оцінювали шляхом преципітації поліетиленгліколем (ПЕГ) 3000. Така розчинність, тобто істинна розчинність, була визначена прямим методом шляхом концентрування антитіл в спеціальному розчині і/або буфері за допомогою центрифужних фільтрів Amicon з подальшим моніторингом якої-небудь преципітації при 25 °C і 5 °C. Стабільність оцінювали методом спектроскопії в ближньому ультрафіолеті - кругової поляризації (УФ-КД) і методом диференціальної скануючої калориметрії (ДСК). Стабільність при заморожуванні і розморожуванні і при підвищених температурах (прискорений тест на стабільність) оцінювали за допомогою ексклюзійної хроматографії (ЕХ). Ці методи детально описані в прикладі 1.8, а результати описані нижче, в розділі: Оцінка розчинності за результатами ПЕГ-преципітації.

У таблицях 24 і 26 вказаний процент ПЕГ 3000, необхідний для індукування преципітації серії клонів E9. Ці клони і еталонний адаліумаб приготувляли в концентрації 0,2 мг/мл. Відповідно до цих результатів було встановлено, що клони, такі як E9-4, E9-14, E9-22 і E9-19, мали розчинність, аналогічну розчинності адаліумабу (приблизно 200 мг/мл), а такі клони, як E9-11 і E9-17, оцінювали як клони, що мають набагато меншу розчинність.

У таблиці 25 вказаний процент ПЕГ 3000, необхідний для індукування преципітації серії стабільних сконструйованих клонів E9. Ці клони і еталонний адаліумаб приготувляли в концентрації 0,2 мг/мл. Відповідно до цих результатів було встановлено, що клони E9-SE1 в даній серії мали найвищу розчинність, але при цьому не передбачалося, що їх розчинність буде аналогічна розчинності адаліумабу (приблизно 200 мг/мл), і такі клони, як E9-SE5, мали набагато меншу розчинність.

Таблиця 24

Процент ПЕГ 3000, необхідний для індукування преципітації
серії антитіл E9 (антитіла приготувляли в концентрації 0,2 мг/мл)

А-номер	Партія №	Антитіло	% ПЕГ 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
		адаліумаб	14.00

Таблиця 25

Процент ПЕГ 3000, необхідний для індукування преципітації серії стабільних сконструйованих антитіл E9 (антитіла приготували в концентрації 0,2 мг/мл)

Антитіло	% ПЕГ 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
адаліумаб	13,00

Таблиця 26

Процент ПЕГ 3000, необхідний для індукування преципітації серії антитіл E9 (антитіла приготували в концентрації 0,2 мг/мл)

Антитіло	% ПЕГ 3000
E9-2B	8,00
E9-1F	8,00
E9	10
адаліумаб	14

Результати скринінгу на істинну розчинність: E9, E9-19, E9-71, E9-2B, E9-1F.

Були одержані розчини, що містять 12 мг E9, E9-71, E9-1F і E9-19 і 5,5 мг E9-2B. E9 являє собою IgG1 мутантного ізо типу. Об'єми всіх розчинів знижували до величини нижче 1 мл шляхом ультрацентрифугування 15-мілілітрових пробірок на центрифугі Amicon 30K.

Після проведення цієї стадії одержували наступні антитіла: E9-2B і E9-19, які були прозорими, і E9, E9-71 і E9-1F, які були злегка каламутними.

У кожену пробірку додавали 10 мл 15 мМ гістидинового буфера при pH 5,03, і розчини знов концентрували до 1 мл. Потім ці розчини переносили в 4-мілілітрові пробірки Amicon 30K і концентрували до найнижчого об'єму, наскільки це можливо.

Після проведення цієї стадії при кімнатній температурі одержували наступні антитіла:

E9: 163 мг/мл; об'єм=0,05 мл; pH=5,12;

E9-19: 132 мг/мл; об'єм=0,05 мл; pH=5,06;

E9-71: 193 мг/мл; об'єм=0,05 мл; pH=5,32;

E9-2B: 64 мг/мл; об'єм=0,1 мл; pH=5,29;

E9-1F: 100 мг/мл; об'єм=0,1 мл; pH=5,31.

Для концентрування антитіл E9-2B і E9-1F була потрібна набагато більша кількість часу, ніж для трьох інших. Це дозволяє передбачити, що їх в'язкість є високою в умовах приготування складів.

Потім розчини залишали на два дні при 5 °C для оцінки розчинності при цій температурі. Були одержані наступні антитіла:

E9: залишалося прозорим при 5 °C і при доведенні до кімнатної температури,

E9-71: залишалося прозорим при 5 °C і при доведенні до кімнатної температури,

E9-1F: виявляло дуже незначну каламутність при 5 °C і ставало прозорим після доведення до кімнатної температури через 20 хвилин,

E9-2B: виявляло незначну каламутність при 5 °C і ставало прозорим після доведення до кімнатної температури через 20 хвилин,

E9-19: виявляло явну каламутність при 5 °C і ставало прозорим після доведення до кімнатної температури через 20 хвилин.

Результати скринінгу на істинну розчинність E9-71

4 мг Е9-71 в розчині концентрували з використанням центрифужних фільтрів Amicon до 60 мг/мл. Якого-небудь осаження або помутніння не спостерігалось ні при 25 °С, ні після зберігання протягом 1 дня при 5 °С.

Характеризація третинної структури за результатами спектроскопії кругового дихроїзму в ближньому діапазоні УФ-випромінювання.

Спектроскопію кругового дихроїзму в ближньому УФ-діапазоні здійснювали для зразків Е9, Е9-19, Е9-71, Е9-2В і Е9-1F при 1 мг/мл. Спектри виявляли сигмоїдальні профілі, що звичайно спостерігаються для "правильно" укладених антитіл. Цим методом не було виявлено якого-небудь неправильного укладання антитіл.

Характеризація внутрішньої стабільності методом диференціальної скануючої калориметрії (ДСК).

ДСК здійснювали на зразках Е9, Е9-19, Е9-71, Е9-2В і Е9-1F в концентрації 1 мг/мл. Результати представлені в таблиці 27. Спочатку визначали температуру, при якій починається розгортання. Крім того, антитіло IgG звичайно проходить три фази розгортання (Tm): розгортання інтактного антитіла, яке асоціюється з плавленням домену CH2 в Fc-фрагменті, плавлення домену CH3 в Fc-фрагменті і плавлення Fab-фрагмента. Попередні величини дозволили передбачити, що найбільш стабільними є антитіла Е9, Е9-19 і Е9-71. Звичайно клони, які мають більш високі величини Tm, є більш переважними, ніж клони з більш низькими величинами.

Таблиця 27

Внутрішня стабільність клонів анти-DLL4 антитіла Е9, визначена методом ДСК при 1 мг/мл

Антитіло	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tm3 (°C)	Вихідні величини (°C)
Е9	64.45	72.12	80.04	54
Е9-19	65.66	77	---	56
Е9-71	65.65	75.36	81.24	54
Е9-2В	64.74	80.58	83.27	52.5
Е9-1F	63.84	80.51	83.26	51.3

Оцінка стійкості до стресу в умовах заморожування-розморожування

Стійкість до стресу в умовах заморожування-розморожування оцінювали для зразків Е9, Е9-19, Е9-71, Е9-2В і Е9-1F в концентрації 1 мг/мл. У таблиці 28 представлені результати ЕХ-аналізу зразків після проведення п'яти циклів заморожування-розморожування. Всі протестовані антитіла виявилися стійкими до стресу в умовах заморожування-розморожування. Якої-небудь явної втрати мономерів не спостерігалось навіть після проведення 5 циклів заморожування-розморожування.

Таблиця 28

Процент мономерних молекул, кількісно визначених за допомогою ЕХ перед заморожуванням при -80 °С і після проведення п'яти циклів заморожування при -80 °С і розморожування при 30 °С на водяній бані для клонів анти-DLL4 антитіл

Антитіло	% мономерів перед заморожуванням	% мономерів після проведення 5 циклів заморожування-розморожування
Е9	99,2	99,3
Е9-19	99,3	99,1
Е9-71	96,9	96,8
Е9-2В	99,0	98,9
Е9-1F	98,6	98,5

Оцінка стабільності при підвищених температурах (прискорена оцінка стабільності)

Стабільність при підвищених температурах оцінювали для зразків Е9, Е9-19, Е9-71, Е9-2В і Е9-1F при концентрації 1 мг/мл. У таблиці 29 представлені результати ЕХ-аналізу зразків на час 0, і через 7 днів і 21 день при 40 °С і 50 °С. Кінетика розщеплення для всіх антитіл показала приблизно 8 %-е зниження процента мономерів через 21 день при 50 °С.

Таблиця 29

Процент різних молекул клонів анти-DLL4 антитіл, визначений за допомогою ЕХ на час 0, і після інкубування протягом 7 днів і 21 дня при 40 °С і 50 °С

(зразки приготувляли в концентрації 1 мг/мл)

Антитіло	% мономерів на час 0	% мономерів через 7 днів при 40 °C	% мономерів через 7 днів при 50 °C	% мономерів через 21 день при 40 °C	% мономерів 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

Антитіло	% агрегатів на час 0	% агрегатів через 7 днів при 40 °C	% агрегатів через 7 днів при 50 °C	% агрегатів через 21 день при 40 °C	% агрегатів 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

Антитіло	% фрагментів на час 0	% фрагментів через 7 днів при 40 °C	% фрагментів через 7 днів при 50 °C	% фрагментів через 21 день при 40 °C	% фрагментів 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

Приклад 10: Оцінка фармакокінетичних властивостей анти-DLL4 антитіл у гризунів

Для оцінки фармакокінетичних властивостей анти-DLL4 антитіл, мишам SCID з природженою відсутністю природних клітин-кілерів (n=3 на антитіло) внутрішньоочеревинно (i.p.) вводили одну дозу антитіла в концентрації 5 або 30 мг/кг, залежно від перехресної реактивності антитіла з мишачим DLL4. У кожної тварини протягом 21 дня безперервно брали проби сироватки (5 мкл цільної крові, розведеної 1:50 в HBS-EP+-буфері в певний момент часу). Концентрації в сироватці визначали із застосуванням DLL4-специфічного методу Віасорге. Коротко, людський DLL4 іммобілізували на сенсорному чипі, і зразки впорскували через проточну кювету при швидкості 5 мкл на хвилину протягом 5 хвилин, а потім вимірювали рівні зв'язування і величини порівнювали зі стандартами. Для оцінки фармакокінетичних параметрів: Стах (максимальна концентрація в сироватці), CL (кліренс) і $t_{1/2}$ (час напівжиття антитіла), використовували криву залежності концентрації в сироватці від часу, і одержані дані систематизували в таблиці 30. Що стосується антитіл E9 і A10 PROfusion, то їх фармакокінетичні властивості були поліпшені завдяки конструюванню CDR в процесі дозрівання афінності.

Таблиця 30

Фармакокінетичні параметри анти-DLL4 антитіл у мишей SCID з природженою відсутністю природних клітин-кілерів

Антитіло	Доза (мг/кг)	Стаж (міс/міл)	CL (мл/год./кг)	t _{1/2} (дні)
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

Приклад 11: Обробка анти-DLL4 антитілом приводила до збільшення розростання ендотеліальних клітин *in vitro*

Аналіз на розростання клітин, присутніх на сферах фібринового гелю, проводили для оцінки *in vitro* активність клітин HUVEC (пасаж 2-3, Lonza) стосовно ангиогенезу, як описано в літературі (Nakatsu et al., Microvasc. Res., 66: 102-112 (2003)). Коротко, розчин фібриногену розводили апротиніном (4 од/мл) і тромбіном (50 од/мл). На 3 сфери з цитодексу (Amersham Pharmacia Biotech) наносили 350-400 клітин HUVEC на сферу і залишали на ніч. Приблизно 20 сфер, покритих HUVEC, поміщали в фібриновий згусток на ямку в 96-ямковій планшети для культивування тканин. Поверх гелю наносили кондиціоноване середовище, що походить від нормальних людських фібробластів (NHLF, Lonza) при конфлюентності 80 %. Після цього в ямку додавали анти-DLL4 антитіло і контрольне антитіло KLH при 15 мкг/мл. На 10 і 12 дні зображення спостерігали за допомогою інвертованого мікроскопа і ПЗС-камери Nikon. Інгибування DLL4 антитілами E9 і A10 приводило до посилення розростання ендотеліальних клітин *in vitro* (дані не наводяться).

Приклад 12: Обробка анти-DLL4 антитілом приводила до інгибування росту пухлини *in vivo*

Вплив анти-DLL4 антитіл на ріст пухлини оцінювали на мишах SCID з природженою відсутністю природних клітин-кілерів, яким підшкірно імплантували пухлинні ксенотрансплантати Calu-6. Коротко, 2×10^6 клітин підшкірно інокулювали в правий задній бік самиць мишей SCID з природженою відсутністю природних клітин-кілерів. Мишей залишали на 14-18 днів для росту пухлин, після чого вимірювали об'єм пухлини в даний момент часу електронним штангенциркулем. Розмір пухлини обчислювали за формулою: $L \times W^2/2$. Мишей розподіляли по експериментальних групах (n=10 на групу) так, щоб кожна група тварин, перед початком проведення терапії, мала еквівалентний середній об'єм пухлини (звичайно в межах від 180 до 250 мм³). Потім тваринам внутрішньоочередово вводили дозу анти-DLL4 антитіл два рази на тиждень протягом двох тижнів (всього 4 дози). Під час проведення експерименту об'єм пухлини вимірювали в середньому два рази на тиждень доти, поки середній об'єм пухлини у мишей в кожній групі не досягав ≥ 2000 мм³. Результати представлені в таблиці 31. Антитіла PROfusion серії E9, що мають поліпшені фармакокінетичні властивості (як показано в прикладі 9), виявляли тенденцію до посилення протипухлинної активності *in vivo*.

Таблиця 31

Ефективність анти-DLL4 антитіл у тварин з моделлю

ксенотрансплантата людського не дрібноклітинного раку легень Calu-6

Обробка	Схема введення доз	% T/C ^a	% ILS ^b
E9	10 мг/кг і.р., 2х/тиждень × 2	43**	52**
E9-10C	10 мг/кг і.р., 2х/тиждень × 2	26**	81**
E9-2B	10 мг/кг і.р., 2х/тиждень × 2	28**	76**
E9-10E	10 мг/кг і.р., 2х/тиждень × 2	30**	70**
E9-19	10 мг/кг і.р., 2х/тиждень × 2	31**	64**
E9-5E	10 мг/кг і.р., 2х/тиждень × 2	30**	57**
E9-71	10 мг/кг і.р., 2х/тиждень × 2	34**	63**
E9-1F	10 мг/кг і.р., 2х/тиждень × 2	34**	57**
E9-12B	10 мг/кг і.р., 2х/тиждень × 2	38**	52**
E9-7E	10 мг/кг і.р., 2х/тиждень × 2	38**	44**
E9-10H	10 мг/кг і.р., 2х/тиждень × 2	41**	52**
E9-66	10 мг/кг і.р., 2х/тиждень × 2	43**	32*

а. %T/C = середній об'єм пухлини у експериментальній групі/об'єм пухлини у контрольній групі × 100. Величини Р (показані зірочками) були одержані при порівнянні експериментальної і контрольної груп із застосуванням t-критерію Стьюдента. Вимірювання проводили на дні 25/26/27.

б. %ILS=(T-C)/C×100, де Т = медіанний час до кінцевого вимірювання в експериментальній групі, а С = медіанний час до кінцевого вимірювання в контрольній групі. Величини Р (показані зірочками) були одержані при порівнянні експериментальної і контрольної груп із застосуванням log-рангового критерію Каплана-Мейєра. Кінцевий об'єм пухлини становив 2000 мм³.

*p<0,05; **p<0,01.

Зміст всіх цитованих документів (включаючи літературні джерела, патенти, патентні заявки і web-сайти), які можуть згадуватися в цій заявці, у всій своїй повноті і у всіх цілях вводяться в даний опис за допомогою посилання.

Еквіваленти

Даний винахід може бути здійснений і в інших конкретних формах, що не виходять за рамки його суті або основних відмітних ознак. Тому всі вищезгадані варіанти у всіх своїх аспектах носять ілюстративний характер і не обмежують даний винахід. Таким чином, обсяг даного винаходу визначений в прикладеній формулі винаходу, а не у вищенаведеному описі, а тому всі внесені зміни не повинні виходити за рамки значень і серії еквівалентів, визначених в формулі винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Abbott Laboratories, Inc.
Morgan-Lappe, Susan E

<120> ТЕРАПЕВТИЧНІ ДІЛІ-39/НЕУВАЖЛИВІ ВІСНКИ

<130> 10289.WO.01

<150> US 61/238,152

<151> 2009-08-29

<160> US 61/261,728

<161> 2009-11-16

<180> 377

<170> Patentin version 3.9

<210> 1

<211> 121

<212> EIDOK

<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Val Glu Leu 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 Glu 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 Glu 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

Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 339

<212> EIDOK

<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 Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Glu 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 Glu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Glu 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
 Glu Pro Arg Glu Pro Glu Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Glu 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 Glu 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

Glu Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 3

<211> 130

<212> SIGHX

<213> Myxine nebulosissima

<220>

<221> Myxine constantia oocyte 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 Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Glu 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
120 125 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Gln Asp Pro Glu Val Lys Phe Asp 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 Gln 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> 105

<212> H1000

<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 Gln 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 Gln 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> HIGOK

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Gln
1 5 10 15

Gln 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 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 Gln Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 6

<211> 30

<212> EIDOK

<213> Група дослідників

<220>

<223> Акцепторна дослідниця важкого ланцюга F61 VH2-70/745

<400> 5

Gln Val Thr Leu Arg Gln 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

<210> 7

<211> 14

<212> B1HCK

<213> Брунча поспіваність

<220>

<223> Ампліторна послідовність важкого ланцюга FR2 VH2-70/JH6

<400> 7

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Gln Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 8

<211> 32

<212> B1HCK

<213> Брунча поспіваність

<220>

<223> Ампліторна послідовність важкого ланцюга FR3 VH2-70/JH6

<400> 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

<210> 9

<211> 11

<212> B1HCK

<213> Брунча поспіваність

<220>

<223> Ампліторна послідовність важкого ланцюга FR4 VH2-70/JH6

<400> 9

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> B1HCK

<213> Брунча поспіваність

<220>

<223> Ампліторна послідовність важкого ланцюга FR1 VH2-26/JH6

<409> 16

Glu	Val	Thr	Leu	Iys	Gln	Ser	Gly	Pro	Val	Leu	Val	Iys	Pro	Thr	Glu
1			5					10						15	

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
20 25 30

4205 11

9212 82

2120 2130X

8213 *Wyeera* *noctipostellata*

59202

02235 *Argemone pinnatifida* Maxim. var. *argentea* FR3 792-26/395

490 11

Arg Len Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Glu 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

4210 12

222 30

212 SYDOR

02137 Bayview Apartments

2320

4223) *Axiasterops* *pacalacensis* *axaster* *axaster* FBI VHS-72/J86

400 12

Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

2019 32

233 34

210 2008

«213» *Myrica neocaledonia*



«223» Акцентоване дослідження захоту лектора РНЗ УНЗ-72/УНЗ/УНЗ

400 13

Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 8 10

1208 12

0019-0000/02/0000-0000\$05.00/0

219 82005

00000000000000000000000000000000

<220>

<223> Амипептида последовательность важного пептида FN3 VH3-72/JH6

<400> 14

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	

Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Gln	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 15

<211> 30

<212> EIDOK

<213> Струна последовательности

<220>

<223> Амипептида последовательность важного пептида FE1 VH3-21/JH6

<400> 15

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	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			

<210> 16

<211> 14

<212> EIDOK

<213> Струна последовательности

<220>

<223> Амипептида последовательность важного пептида FE2 VH3-21/JH6

<400> 16

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Gln	Trp	Val	Ser			
1			5						10							

<210> 17

<211> 32

<212> EIDOK

<213> Струна последовательности

<220>

<223> Амипептида последовательность важного пептида FE3 VH3-21/JH6

<400> 17

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	

Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Gln	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 18
 <211> 30
 <212> EDSOR
 <213> Структурная информация
 <220>
 <223> Акцентуация структурной информации FR1 VBI-69/JH6
 <400> 18

Glu Val Glu Leu Val Glu 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> 18
 <211> 14
 <212> EDSOR
 <213> Структурная информация
 <220>
 <223> Акцентуация структурной информации FR2 VBI-69/JH6
 <400> 18

Tyr Val Arg Glu Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 20
 <211> 32
 <212> EDSOR
 <213> Структурная информация
 <220>
 <223> Акцентуация структурной информации FR3 VBI-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> EDSOR
 <213> Структурная информация
 <220>
 <223> Акцентуация структурной информации FR1 VBI-18/JH6
 <400> 21

Glu Val Glu Leu Val Glu 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> BLKOK

<213> Штука дослідності

<220>

<221> Агенеторна дослідність важкого ланцюга PR3 VH1-18/JRG

<400> 22

Arg Val Thr Ser Thr Thr Asp Thr Ser Thr 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> BLKOK

<213> Штука дослідності

<220>

<221> Агенеторна дослідність легкого ланцюга PR1 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> BLKOK

<213> Штука дослідності

<220>

<221> Агенеторна дослідність легкого ланцюга PR2 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> BLKOK

<213> Штука дослідності

<220>

<221> Агенеторна дослідність легкого ланцюга PR3 B3/JK4

<400> 25

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 3 5 10 15

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

<210> 24
 <211> 11
 <212> SIPOK
 <213> Вступна послідовність

<220>
 <223> Акценторна послідовність легкого ланцюга FR4 B3/JK4

<400> 24

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 27
 <211> 21
 <212> SIPOK
 <213> Вступна послідовність

<220>
 <223> Акценторна послідовність легкого ланцюга 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> 23
 <211> 15
 <212> SIPOK
 <213> Вступна послідовність

<220>
 <223> Акценторна послідовність легкого ланцюга FP2 L2/JK4

<400> 23

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 29
 <211> 32
 <212> SIPOK
 <213> Вступна послідовність

<220>
 <223> Акценторна послідовність легкого ланцюга FP3 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> B1HOK

<213> Штука дослідності

<220>

<223> Акваторна дослідність легкого ланцюга FR1 L15/JK4

<400> 30

Asp Ile Glu 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> B1HOK

<213> Штука дослідності

<220>

<223> Акваторна дослідність легкого ланцюга FR2 L15/JK4

<400> 31

Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 32

<211> 32

<212> B1HOK

<213> Штука дослідності

<220>

<223> Акваторна дослідність легкого ланцюга 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> B1HOK

<213> Штука дослідності

<220>

<223> Аминокислотная последовательность легкого цепи FPI 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> 13

<212> BIRCK

<213> Штука последовательности

<220>

<223> Аминокислотная последовательность легкого цепи FPI 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> BIRCK

<213> Штука последовательности

<220>

<223> Аминокислотная последовательность тяжелого цепи FPI YCHV4-59

<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> BIRCK

<213> Штука последовательности

<220>

<223> Аминокислотная последовательность тяжелого цепи FPI YCHV4-59

<400> 36

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 37

<211> 30

<212> BIRCK

<213> Штука последовательности

<220>

<223> Акценторна дослідницька важкого ланцюга FR3 IGHV4-59

<400> 37

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Thr 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> BLINK

<213> Стучна дослідницька

<220>

<223> Акценторна дослідницька важкого ланцюга FR4 IGHV4-59/JR

<400> 38

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 39

<211> 30

<212> BLINK

<213> Стучна дослідницька

<220>

<223> Акценторна дослідницька важкого ланцюга FW1 IGHV3-66

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Gln 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> BLINK

<213> Стучна дослідницька

<220>

<223> Акценторна дослідницька важкого ланцюга FW2 IGHV3-66

<400> 40

Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 41

<211> 32

<212> BLINK

<213> Стучна дослідницька

<220>

<223> Аминокислотная последовательность важного пептида FWS IGHV3-66

<400> 41

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Ser Phe Tyr Leu Glu
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 42

<211> 11

<212> BLOCK

<213> Стучна дослідницька

<220>

<223> Аминокислотная последовательность важного пептида FWA IGHV3-66/78

<400> 42

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 43

<211> 30

<212> BLOCK

<213> Стучна дослідницька

<220>

<223> Аминокислотная последовательность важного пептида FRI IGHV4-59

<400> 43

Glu Val Gln Leu Glu 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> BLOCK

<213> Стучна дослідницька

<220>

<223> Аминокислотная последовательность важного пептида FA2 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> BLOCK

<213> Стучна дослідницька

<220>

<223> Акценторна последователност на жабата ланцета FR3 IGHV4-56

<400> 45

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asp Gln Phe Tyr Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Arg Ala Gln Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 46

<211> 11

<212> BIRCK

<213> Бручна последователност

<220>

<223> Акценторна последователност на жабата ланцета FR4 IGHV4-55/IR

<400> 46

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 47

<211> 30

<212> BIRCK

<213> Бручна последователност

<220>

<223> Акценторна последователност на жабата ланцета FR1 IGHV5-51

<400> 47

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Thr Gln Val Lys Lys Pro Gly Gln
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> BIRCK

<213> Бручна последователност

<220>

<223> Акценторна последователност на жабата ланцета FR2 IGHV5-51

<400> 48

Trp Ile Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 49

<211> 32

<212> BIRCK

<213> Бручна последователност

<220>

<223> Аминокислотная последовательность важного пептида F83 IGHV3-51

<400> 49

Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Phe Ser 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> ELDCK

<213> Штука последовательности

<220>

<223> Аминокислотная последовательность важного пептида F83 IGHV3-51/7E

<400> 50

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 51

<211> 30

<212> ELDCK

<213> Штука последовательности

<220>

<223> Аминокислотная последовательность важного пептида F81 IGHV3-70

<400> 51

Gln Val Thr Leu Arg Gln 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> ELDCK

<213> Штука последовательности

<220>

<223> Аминокислотная последовательность важного пептида F82 IGHV2-70

<400> 52

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 53

<211> 32

<212> ELDCK

<213> Штука последовательности

<220>

<223> Аминокислотная последовательность важного пептида FR1 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> EIDOK

<213> Стучина последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность важного пептида FR1 IGHV2-70/JH

<400> 54

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 55

<211> 30

<212> EIDOK

<213> Стучина последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность важного пептида FR1 IGHV3-15

<400> 55

Gln Val Gln Leu Leu Gln 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> EIDOK

<213> Стучина последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность важного пептида FR2 IGHV3-15

<400> 56

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val Ala
1 5 10

<210> 57

<211> 32

<212> EIDOK

<213> Стучина последовательность

<220>

<221> Антигенная специфичность сахарного мануша 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> B1HOK

<213> Матрица специфичности

<220>

<221> Антигенная специфичность сахарного мануша FR3 IGHV3-15/3H

<400> 58

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 59

<211> 30

<212> B1HOK

<213> Матрица специфичности

<220>

<221> Антигенная специфичность сахарного мануша FR1 IGHV3-43

<400> 59

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Glu 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> B1HOK

<213> Матрица специфичности

<220>

<221> Антигенная специфичность сахарного мануша FR3 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> B1HOK

<213> Матрица специфичности

<220>

<223> Ацилаторна послідовність важкого ланцюга FR3 IGHV3-43

<400> 61

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

<210> 62

<211> 11

<212> BLIOX

<213> Група послідовності

<220>

<223> Ацилаторна послідовність важкого ланцюга FR4 IGHV3-43/44

<400> 62

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1			5				10			

<210> 63

<211> 22

<212> BLIOX

<213> Група послідовності

<220>

<223> Ацилаторна послідовність легкого ланцюга FR1 IGLV3-1

<400> 63

Ser	Tyr	Gln	Leu	Thr	Gln	Pro	His	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln
1			5					10					15		

Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys
			20		

<210> 64

<211> 18

<212> BLIOX

<213> Група послідовності

<220>

<223> Ацилаторна послідовність легкого ланцюга FR2 IGLV3-1

<400> 64

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
1			5					10					15	

<210> 65

<211> 33

<212> BLIOX

<213> Група послідовності

<220>

<223> Аминокислотная последовательность легкого цепи PR3 IGLV3-1

<400> 65

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> 66

<211> 10

<212> SIHCK

<213> Штука последовательности

<220>

<223> Аминокислотная последовательность легкого цепи PR4 IGLV3-1/JL

<400> 66

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
1 5 10

<210> 67

<211> 22

<212> SIHCK

<213> Штука последовательности

<220>

<223> Аминокислотная последовательность легкого цепи PR1 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> 13

<212> SIHCK

<213> Штука последовательности

<220>

<223> Аминокислотная последовательность легкого цепи PR2 IGLV3-1

<400> 68

Trp Tyr Glu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 69

<211> 32

<212> SIHCK

<213> Штука последовательности

<220>

<225> Аминокислотная последовательность пептида пептида 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> BLAST

<213> Штука последовательности

<220>

<223> Аминокислотная последовательность пептида пептида FR4 IGLV3-1/II

<400> 70

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
1 5 10

<210> 71

<211> 21

<212> BLAST

<213> Штука последовательности

<220>

<223> Аминокислотная последовательность пептида пептида 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> BLAST

<213> Штука последовательности

<220>

<223> Аминокислотная последовательность пептида пептида 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> BLAST

<213> Штука последовательности

<220>

<223> Акцентопна посидованіа, сергоа лануа F83 IGLV3-1

<400> 73

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> 74

<211> 10

<212> SIKOK

<213> Струна посидованіа

<220>

<223> Акцентопна посидованіа, сергоа лануа F83 IGLV3-1/JL

<400> 74

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
1 5 10

<210> 75

<211> 22

<212> SIKOK

<213> Струна посидованіа

<220>

<223> Акцентопна посидованіа, сергоа лануа F83 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> SIKOK

<213> Струна посидованіа

<220>

<223> Акцентопна посидованіа, сергоа лануа F83 IGLV3-1

<400> 76

Arg Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 77

<211> 30

<212> SIKOK

<213> Струна посидованіа

<220>

<223> Актиноторна послідовність легкого ланцюга FR3 IGLV3-1

<400> 77

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 Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys
20 25 30

<210> 78

<211> 11

<212> SLECK

<213> Штука послідовність

<220>

<223> Актиноторна послідовність легкого ланцюга 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> SLECK

<213> Штука послідовність

<220>

<223> Актиноторна послідовність легкого ланцюга FR1 IGV6D-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> SLECK

<213> Штука послідовність

<220>

<223> Актиноторна послідовність легкого ланцюга FR2 IGV6D-21

<400> 80

Thr Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 81

<211> 22

<212> SLECK

<213> Штука послідовність

<220>

<223> Аминокислотная последовательность перекиси ханшуса FR3 IGVSD-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> BLAST

<213> Штука последовательности

<220>

<223> Аминокислотная последовательность перекиси ханшуса FR4 IGVSD-21/JK

<400> 82

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 83

<211> 23

<212> BLAST

<213> Штука последовательности

<220>

<223> Аминокислотная последовательность перекиси ханшуса FR1 IGVSD-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> BLAST

<213> Штука последовательности

<220>

<223> Аминокислотная последовательность перекиси ханшуса FR2 IGVSD-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> BLAST

<213> Штука последовательности

<220>

<223> Aminoacids poslidovnist' narkogo zanzara PR3 ICKV3D-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 Glu Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 86

<211> 11

<212> ELSOK

<213> Штука послідовність

<220>

<223> Aminoacids poslidovnist' narkogo zanzara PR4 ICKV3D-15/JK

<400> 86

Phe Gly Glu Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 87

<211> 23

<212> ELSOK

<213> Штука послідовність

<220>

<223> Aminoacids poslidovnist' narkogo zanzara PR1 ICKV4-1

<400> 87

Asp Tyr Val Leu Thr Glu 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> ELSOK

<213> Штука послідовність

<220>

<223> Aminoacids poslidovnist' narkogo zanzara PR2 ICKV4-1

<400> 88

Irp Tyr Glu Glu Lys Pro Gly Glu Ser Phe Lys Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 89

<211> 32

<212> ELSOK

<213> Штука послідовність

<220>

<223> Амелиторна послідовність ланцюга FR3 IGRV4-1

<400> 89

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Asp 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> BIRBK

<213> Група послідовності

<220>

<223> Амелиторна послідовність ланцюга FR4 IGRV4-1/JK

<400> 90

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 91

<211> 22

<212> BIRBK

<213> Група послідовності

<220>

<223> Амелиторна послідовність ланцюга FR1 IGLV3-1

<400> 91

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
20

<210> 92

<211> 15

<212> BIRBK

<213> Група послідовності

<220>

<223> Амелиторна послідовність ланцюга FR2 IGLV3-1

<400> 92

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ala Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 93

<211> 32

<212> BIRBK

<213> Група послідовності

<220>

<223> Акценторна дослідницька паркова ланцюга PB3 IGLV3-1

<400> 93

Gly Ile Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Asp 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> BLANK

<213> Вступна дослідницька

<220>

<223> Акценторна дослідницька паркова ланцюга PB4 IGLV3-1/35

<400> 94

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
1 5 10

<210> 95

<211> 22

<212> BLANK

<213> Вступна дослідницька

<220>

<223> Акценторна дослідницька паркова ланцюга PB1 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> BLANK

<213> Вступна дослідницька

<220>

<223> Акценторна дослідницька паркова ланцюга PB2 IGLV3-1

<400> 96

Arg Tyr Glu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 97

<211> 23

<212> BLANK

<213> Вступна дослідницька

<220>

<221> Акцентуна послідовність легкого ланцюга FR3 IGLV3-1

<400> 97

Gly Ile Phe Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asp Ser Gly Asn Thr Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Glu Thr Met Asp Gly Ala Asp Tyr Leu Cys
20 25 30

<210> 98

<211> 16

<212> BLJHOM

<213> Научна послідовність

<220>

<221> Акцентуна послідовність легкого ланцюга FR4 IGLV3-1/JL

<400> 98

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
1 5 10

<210> 99

<211> 7

<212> BLJHOM

<213> Научна послідовність

<220>

<221> Консенсуна послідовність CDR-H1 анти-DLL4 антитіла

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X являє собою B або G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> X являє собою S, G або B

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X являє собою S, N, T, G або R

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> X являє собою Y або H

<400> 99

Kaa Kaa Kaa Tyr Kaa Tyr Gly
1 5

<210> 100

<211> 16

<212> BLJHOM

```

<213> Штучна послідовність
<220>
<221> Консервувана послідовність CDR-H2 анти-BLL4 antibody
<222> (3)..(3)
<223> X налягає собою Y, N або Z
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X налягає собою T, H, R, I, E або R
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X налягає собою S, N, T або G
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> X налягає собою S, R, D або G
<400> 100
Asp Ile Lys Tyr Lys Gly Lys Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Lys
1 5 10 15
<210> 101
<211> 11
<212> BLAST
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> Консервувана послідовність CDR-H3 анти-BLL4 antibody
<222> (11)..(11)
<223> X налягає собою E, Y, F, Q, W, L або S
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(2)
<223> X налягає собою D, A, S, G, Y, E або H
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X налягає собою V, M, L, P або R
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X налягає собою I, A, F, R, S, K, Q, Y, G, D, або E
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)

```

<223> X являє собою L, Y, F або M.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> X являє собою R, G, S, Q або A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> X являє собою G, A або E

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> X являє собою S, T, L, V, R або G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> X являє собою Y, D, S, N, H, E, R, L, P, C, I, M, T, Q або K

<400> 101

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Asp Xaa

1 5 10

<210> 102

<211> 11

<212> BLUHM

<213> Штука дослідження

<220>

<223> Консенсусна послідовність CDR-L1 анти-CD14 антитіла

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X являє собою Q, E або D

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> X являє собою R, S, G, M, K, L або T

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> X являє собою D або E

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X являє собою A або V

<400> 102

Ser Gly Xaa Xaa Asp Gly Xaa Lys Tyr Xaa Ser

1 5 10

<210> 103

<211> 7
 <212> B100H
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Компьютерная последовательность CDR-L3 анти-DLL4 антигена

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Y являе собой K aGG Q
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(3)
 <223> X являе собой Z, L, T, A, B aGG F

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(5)
 <223> H являе собой K, T, A, N, Q, S aGG M

<400> 103

Xaa Arg Xaa Xaa Arg Pro Ser
 1 5

<210> 104
 <211> 9
 <212> B100H
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Компьютерная последовательность CDR-L3 анти-DLL4 антигена

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X являе собой R, S, N, E, N, G aGG K

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Y являе собой Q aGG E

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X являе собой T, V, A, S aGG M

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Y являе собой G, A aGG C

<400> 104

Gln Ala Trp Arg Xaa Xaa Xaa Val
 1 5

<210> 105
 <211> 5
 <212> БІНДОК
 <213> Научна послідовність
 <220>
 <221> Консенсусна послідовність CDR-H1 анти-BLL4 антитіла

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X являє собою B, N або D

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X являє собою H або Y

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X являє собою S або R

<400> 105

Xaa Xaa Tpr Met Xaa
 1 5

<210> 105
 <211> 17
 <212> БІНДОК
 <213> Научна послідовність
 <220>
 <221> Консенсусна послідовність CDR-H2 анти-BLL4 антитіла

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X являє собою I, D, N або T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X являє собою Y, H, E, Q, V, T, K або O

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X являє собою S, E, I, T, G, K, N або K

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> X являє собою N, Y, S, I або T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> X являє собою E, W, H, Q, E, T, K, E, A або L

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X являє собою Y, D або E

<210>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X являє собою S або Y

<400> 104

```

```

Yaa Ile Ser Xaa Asp Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Asp Ser Val Lys
1           5              10              15

```

Gly

```

<210> 107
<211> 10
<212> БІЛК
<213> Научна послідовність

<220>
<223> Консенсусна послідовність CD8-RE анти-CD4 антитіла

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X являє собою C, A або R

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X являє собою G, S або A

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Z являє собою V або M

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X являє собою E, L, Y або H

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X являє собою I, S або L

```

```

<400> 107

```

```

Ala Xaa Gly Xaa Met Xaa Gly Xaa Asp Xaa
1           5              10

```

```

<210> 108
<211> 11
<212> БІЛК
<213> Научна послідовність

```

<220>
 <223> Консервированная последовательность CDK-11 анти-DNA антигена

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X являе собой S або F

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X являе собой K, R, L, Q, M, E, S, T, G або D

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X являе собой T, S, N, E, G або E

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> X являе собой K, Q, N або R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> X являе собой V або I

<400> 108

Ser Xaa Asp Xaa Leu Gly Xaa Xaa Tyr Xaa Ser
 1 5 10

<210> 109
 <211> 7
 <212> BIRCH
 <213> Штука последовательности

<220>
 <223> Консервированная последовательность CDK-12 анти-DNA антигена

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X являе собой A, G, W, S або G

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X являе собой K, W, Q, W, L, T, I або E

<400> 109

Gln Asp Xaa Xaa Arg Pro Ser
 1 5

<210> 110
 <211> 9
 <212> BIRCH

```

<213> Именная последовательность

<220>
<221> Консенсусная последовательность CDR-L3 анти-CD24 антитела

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X являе собой G або A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X являе собой R, S, Q, P, A, V, W або M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X являе собой S, G, I, N, R або T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X являе собой D або G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X являе собой V, A, F або E

<402> 110

Gln Ser Trp Asp Xaa Xaa Xaa Val
1 5

<210> 111
<211> 106
<212> BLINK
<213> Homo sapiens

<400> 111

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Phe Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr His
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln 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
 88 90 98

Phe Gly Tyr Gly Thr Arg Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 112
 <211> 115
 <212> HINGON
 <213> Homo sapiens

<400> 112

Glu Val Glu 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 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 Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ala Gly 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> HINGON
 <213> Homo sapiens

<400> 113

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Ser 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 Gln Arg Phe Ser Gly Ser
 53 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met
 65 70 75 80

Asp Gln Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Ser Trp Asp Arg Ser Asp Val Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 119
 <211> 121
 <212> BLANK
 <213> Бланк последовательности

<220>
 <221> mutation в последовательности VH аминокислот 89

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> X явное сходство S, N, G с G R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> X явное сходство S с G R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> X явное сходство S, G с G R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (33)..(33)
 <223> X явное сходство S, R, T, G с G R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (42)..(42)
 <223> X явное сходство F, S с G L

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (34)..(34)
 <223> X явное сходство Y с G R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (36)..(36)
 <223> X явное сходство F, N, A, I, S с G R

<220>
 <221> MISC_FEATURE

```

<222> (55)..(55)
<223> X являе собой S, N, T або G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (57)..(57)
<223> X являе собой S, N, D або G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (59)..(59)
<223> X являе собой A або E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (100)..(100)
<223> X являе собой E, Y, F, Q, W, L або A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (101)..(101)
<223> X являе собой D, A, S, G, V, E або H

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (102)..(102)
<223> X являе собой V, M, L або F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (103)..(103)
<223> X являе собой I, A, P, P, S, E, Q, V, G, H або E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (104)..(104)
<223> X являе собой L, Y, F або M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (105)..(105)
<223> X являе собой R, S, S, Q або A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (107)..(107)
<223> X являе собой G, E або A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (108)..(108)
<223> X являе собой S, A, L, W або R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (110)..(110)
<223> X являе собой Y, C, S, W, R, E, K, L, P, C, I або M

<400> 114

```

```

Gly Val Gly Leu Gly Gly Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
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> 105
<212> SINGLE
<213> Жгутина послідовність

<220>
<223> мутації в послідовності VI жгутилка B9

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> X являє собою Q, S або D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(26)
<223> X являє собою R, S, G, M, F, L або T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> X являє собою D або E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)
<223> X являє собою A або V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (49)..(49)
<223> X являє собою E або Q

<220>
<221> MISC_FEATURE

```

<222> (51)..(51)
 <223> X являе собой S, L, T, A, E або F
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (52)..(52)
 <223> X являе собой K, T, E, N, Q, S або M

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (79)..(79)
 <223> X являе собой P або A

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (92)..(92)
 <223> X являе собой K, S, M, E, N або K

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (93)..(93)
 <223> X являе собой D або E

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (94)..(94)
 <223> X являе собой Y, V, A, S або M

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (95)..(95)
 <223> X являе собой G, A або C

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (99)..(99)
 <223> X являе собой Y або S

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (100)..(100)
 <223> X являе собой H або K

<400> 115

Ser Tyr Glu Leu Thr Glu Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asn Asn Leu Gly Asn Lys Tyr Asn
 20 25 30

Ser Trp Tyr Glu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Asn Asp Asn 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 Asn Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Ala Trp Asp Lys Xaa Xaa Xaa Val
85 30 95

Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Val Thr Val Leu
100 105

<210> 116
<211> 121
<212> SIKOK
<213> Erythra noctuides

<220>
<221> VH-соединяет аспинго эпизоро ауто-DEL4 аутокина E9.4

<400> 116

Glu Val Glu Leu Glu 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 Glu 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 Glu 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

Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 117
<211> 7
<212> SIKOK
<213> Erythra noctuides

<220>
<221> CDR-H1 ауто-DEL4 аутокина E9.4

<400> 117

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 118
 <211> 16
 <212> BIRCK
 <213> *Myxoma moniliococcum*

<220>
 <221> CDR-H2 same-DLL4 antiuzina E9.4

<400> 118

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 119
 <211> 11
 <212> BIRCK
 <213> *Myxoma moniliococcum*

<220>
 <221> CDR-H2 same-DLL4 antiuzina E9.4

<400> 119

Tyr Asp Val Ser Leu Gly Gly Ser Ser Asp Ala
 1 5 10

<210> 120
 <211> 121
 <212> BIRCK
 <213> *Myxoma moniliococcum*

<220>
 <221> VH-cDNA same-DLL4 antiuzina E9.11

<400> 120

Glu Val Gln Leu Gln Gln 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 Asp Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ser 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 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> BLANK
<213> Бруна мочковатая

<220>
<223> CDR-H1 анти-DLL4 антитело E9.11

<400> 121

Ser Ser Ser Tyr Tyr Tyr Gly
1 5

<210> 122
<211> 16
<212> BLANK
<213> Бруна мочковатая

<220>
<223> CDR-H2 анти-DLL4 антитело 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> BLANK
<213> Бруна мочковатая

<220>
<223> CDR-H3 анти-DLL4 антитело E9.11

<400> 123

Glu Ala Val Pro Leu Gly Gly Gly Ser Asp Tyr
1 5 10

<210> 124
<211> 121
<212> BLANK
<213> Бруна мочковатая

<220>
<223> VH-область анти-DLL4 антитела E9.11

<400> 124

Glu Val Gln Leu Gln Glu Thr 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 His Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Gln
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 Gln Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gln 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> ?

<212> EIDOK

<213> Ступня дослідження

<220>

<223> CDR-H1 anti-DLL4 антитіла E9.14

<400> 125

Asn Ser Arg Tyr His Trp Gly
1 5

<210> 126

<211> 16

<212> EIDOK

<213> Ступня дослідження

<220>

<223> CDR-H2 anti-DLL4 антитіла 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> EIDOK

<213> Ступня дослідження

<220>

<223> CDR-H3 anti-DLL4 антитіла E9.14

<400> 127

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr
1 5 10

<210> 128
<211> 121
<212> BLANK
<213> Bryana neohimantem

<220>
<223> VU-000000000000-000000000000 ES.17

<400> 128

Glu Val Glu Leu Glu 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 Glu 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 Glu 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 Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 128
<211> ?
<212> BLANK
<213> Bryana neohimantem

<220>
<223> CDR-H1 000000000000-000000000000 ES.17

<400> 128

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 130
<211> 16
<212> BLANK
<213> Bryana neohimantem

<220>

<223> CDR-H2 anti-GLA murine E9.17

<400> 130

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 131

<211> 11

<212> EIDCK

<213> Мышь неослиговича

<220>

<223> CDR-H3 anti-GLA murine E9.17

<400> 131

Gln Glu Ala Ile Leu Gly Gly Gly Ser Asp Tyr
 1 5 10

<210> 132

<211> 121

<212> EIDCK

<213> Мышь неослиговича

<220>

<223> VH-08uacrs anti-GLA murine E9.18

<400> 132

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 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 Asy 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> ELMGF
 <213> Метод машинного
 <220>
 <223> CDR-H1 anti-BCL4 антитела E9.18
 <400> 133

Ser Ser Gly Tyr Tyr Trp Gly
 1 5

<210> 134
 <211> 16
 <212> ELMGF
 <213> Метод машинного
 <220>
 <223> CDR-H2 anti-BCL4 антитела E9.18
 <400> 134

Asp His Asn Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 135
 <211> 11
 <212> ELMGF
 <213> Метод машинного
 <220>
 <223> CDR-H3 anti-BCL4 антитела E9.18
 <400> 135

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr
 1 5 10

<210> 136
 <211> 121
 <212> ELMGF
 <213> Метод машинного
 <220>
 <223> VH-CDR3 anti-BCL4 антитела E9.18
 <400> 136

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys 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 Gln
 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 Glu 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 Gly Ser Asp Thr Tyr Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 127

<211> 7

<212> BIRCH

<213> Мезуна розовоцветная

<220>

<223> COR-H1 anti-ULL4 antibody B9.19

<400> 127

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 138

<211> 16

<212> BIRCH

<213> Мезуна розовоцветная

<220>

<223> COR-H2 anti-ULL4 antibody B9.19

<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> BIRCH

<213> Мезуна розовоцветная

<220>

<223> COR-H3 anti-ULL4 antibody B9.19

<400> 139

Phe Asp Val Ser Leu Gly Gly Gly Ser Asp Thr
1 5 10

<210> 140

<211> 121

<212> SIDOR

<213> Структа неопределена

<220>

<223> VH-область анти-BLL4 антитела ES.22

<400> 140

Glu Val Glu Leu Glu 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 Glu 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 Glu 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> SIDOR

<213> Структа неопределена

<220>

<223> CDR-H1 анти-BLL4 антитела ES.22

<400> 141

Asn Ser Arg Tyr His Trp Gly
1 5

<210> 142

<211> 16

<212> SIDOR

<213> Структа неопределена

<220>

<223> CDR-H2 анти-BLL4 антитела ES.22

<400> 143

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 143

<211> 11

<212> EIDNOK

<213> Вступна послідовність

<220>

<223> CDR-H3 анта-DLL4 антитіла E9.22

<400> 143

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr
 1 5 10

<210> 144

<211> 121

<212> EIDNOK

<213> Вступна послідовність

<220>

<223> VH-селекція анта-DLL4 антитіла E9.48

<400> 144

Glu Val Glu Leu Glu 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 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

<210> 145

<211> ?

<212> EISOK
 <213> Вступна послідовність
 <220>
 <223> CDR-H1 анти-DLL4 антитіла E9.48
 <400> 145

Ser Ser Gly Tyr Tyr Trp Gly
 1 5

<210> 146
 <211> 16
 <212> EISOK
 <213> Вступна послідовність

<220>
 <223> CDR-H2 анти-DLL4 антитіла 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> EISOK
 <213> Вступна послідовність

<220>
 <223> CDR-H3 анти-DLL4 антитіла E9.48
 <400> 147

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr
 1 5 10

<210> 148
 <211> 121
 <212> EISOK
 <213> Вступна послідовність

<220>
 <223> VH-область анти-DLL4 антитіла E9.55
 <400> 148

Glu Val Glu Leu Glu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Asp Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Asn Ser
 20 25 30

Arg Tyr His Trp Gly Trp Ile Arg Glu 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
85 76 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> BLAST

<213> Научна дослідницька

<220>

<221> CDR-H1 anti-BCL4 антитіла E9.65

<400> 149

Asn Ser Arg Tyr His Trp Gly
1 5

<210> 150

<211> 16

<212> BLAST

<213> Научна дослідницька

<220>

<221> CDR-H2 anti-BCL4 антитіла 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> BLAST

<213> Научна дослідницька

<220>

<221> CDR-H3 anti-BCL4 антитіла E9.65

<400> 151

Gln Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr
1 5 10

<210> 152

<211> 121

<212> BLAST

<213> Научна дослідницька

<220>

<223> VR-αβнама антн-DIL4 автетина E9.66

<400> 153

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys 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 Gln
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 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

<210> 153

<211> 7

<212> BIRGM

<213> Брунаа номиниовица

<220>

<223> CDK-H1 антн-DIL4 автетина E9.66

<400> 153

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 154

<211> 16

<212> BIRGM

<213> Брунаа номиниовица

<220>

<223> CDK-H2 антн-DIL4 автетина E9.66

<400> 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> BLANK
 <213> Матрица полинуклеотидов

<220>
 <221> CDR-H3 анта-DM4 антитела B9.66

<400> 155

Glu Gly Val Pro Leu Gly Gly Gly Ala Asp Lys
 1 5 10

<210> 156
 <211> 121
 <212> BLANK
 <213> Матрица полинуклеотидов

<220>
 <221> VB-область анта-DM4 антитела B3.71

<400> 156

Glu Val Glu Leu Glu 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 Glu 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 Glu 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 Leu Ala Met Gly Gly Gly Ser Asp Lys Trp Gly
 100 105 110

Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 157
 <211> 1
 <212> BLANK
 <213> Матрица полинуклеотидов

<220>

<223> CDR-H1 anti-DLL4 antibody ES.71

<400> 157

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 158

<211> 16

<212> B1H0K

<213> Myoma monoclonal

<220>

<223> CDR-H2 anti-DLL4 antibody ES.71

<400> 158

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 159

<211> 11

<212> B1H0K

<213> Myoma monoclonal

<220>

<223> CDR-H3 anti-DLL4 antibody ES.71

<400> 159

Gln Ala Leu Ala Met Gly Gly Gly Ser Asp Lys
1 5 10

<210> 160

<211> 121

<212> B1H0K

<213> Myoma monoclonal

<220>

<223> VH-CDR3 anti-DLL4 antibody ES.15

<400> 160

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys 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 Gln
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 Val Lys Asn Gln Thr
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 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> BIROK

<213> Мутант неочищенный

<220>

<223> CDR-H1 анти-GLL4 антитела E9.13

<400> 161

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 162

<211> 16

<212> BIROK

<213> Мутант неочищенный

<220>

<223> CDR-H2 анти-GLL4 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> BIROK

<213> Мутант неочищенный

<220>

<223> CDR-H3 анти-GLL4 антитела E9.13

<400> 163

Gln Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr
1 5 10

<210> 164

<211> 121

<212> BIROK

<213> Мутант неочищенный

<220>

<223> VH-CDR3 анти-GLL4 антитела E9.16

<400> 164

Glu Val Gln Leu Gln Gln 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 Gln
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 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> 185

<211> 7

<212> EISOK

<213> Erynnu nochinomikoto

<220>

<223> CDP-H1 анки-ELL4 анкиина E9.16

<400> 185

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 166

<211> 16

<212> EISOK

<213> Erynnu nochinomikoto

<220>

<223> CDP-H2 анки-ELL4 анкиина E9.16

<400> 186

Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 167

<211> 11

<212> BLNCK

<213> Матрица поочисловности

<220>

<221> CDR-H3 анти-BL14 антигена E9.18

<400> 147

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr
1 5 10

<210> 148

<211> 121

<212> BLNCK

<213> Матрица поочисловности

<220>

<221> VH-область анти-BL14 антигена E9.18

<400> 148

Glu Val Gln Leu Gln Gln 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 Leu 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> BLNCK

<213> Матрица поочисловности

<220>

<221> CDR-H1 анти-BL14 антигена E9.18

<400> 149

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 170
<211> 16
<212> EHHKK
<213> Буква неопределена.

<220>
<223> CDR-H2 анти-BCL4 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> EHHKK
<213> Буква неопределена.

<220>
<223> CDR-H3 анти-BCL4 антитела E9.38
<400> 171

Glu Asp Val Ile Leu Arg Gly Gly Ser Asp Tyr
1 5 10

<210> 172
<211> 121
<212> EHHKK
<213> Буква неопределена.

<220>
<223> VH-область анти-BCL4 антитела E9.38
<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 Gly Leu Gln
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 Gly 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> BIROK

<213> Штука неопознана

<220>

<223> CGR-H1 антi-DLL4 антитела E9.2B

<400> 173

Ser Ser Asn Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 174

<211> 14

<212> BIROK

<213> Штука неопознана

<220>

<223> CGR-H2 антi-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> BIROK

<213> Штука неопознана

<220>

<223> CGR-H3 антi-DLL4 антитела E9.2B

<400> 175

Glu Ala Val Ala Leu Gly Gly Gly Ala Asp Asp
1 5 10

<210> 176

<211> 121

<212> BIROK

<213> Штука неопознана

<220>

<223> VR-опакта антi-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 Glu Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Ser 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 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> E1HCK

<213> Базуна поспиносива

<220>

<223> CDR-H1 анти-GL14 антитела E9.1F

<400> 177

Ser Gly Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 178

<211> 16

<212> E1HCK

<213> Базуна поспиносива

<220>

<223> CDR-H2 анти-GL14 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> 178

<211> 11

<212> E1HCK

<213> Базуна поспиносива

<220>

<223> CDR-H3 aaMW-DLL4 asparagine E9.1F

<400> 173

Glu Ala Val Ser Phe Gly Gly Gly Ala Asp Ser
1 5 10

<210> 180

<211> 121

<212> BLROW

<213> Myxoma moniliformis.

<220>

<223> VH-epsilon aaMW-DLL4 asparagine E9.10H

<400> 193

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 Glu 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 Gln 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

<210> 181

<211> 7

<212> BLROW

<213> Myxoma moniliformis.

<220>

<223> CDR-H1 aaMW-DLL4 asparagine E9.10H

<400> 161

Ser Ser Gly Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 182
 <211> 16
 <212> BIROR
 <213> Матрица нуклеотидов
 <220>
 <223> CDK-H2 анти-ULL4 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> BIROR
 <213> Матрица нуклеотидов
 <220>
 <223> CDK-H2 анти-ULL4 антитела E9.10H
 <400> 183

Glu Glu Val Ile Leu Gly Gly Gly Ala Asp Glu
 1 5 10

<210> 184
 <211> 121
 <212> BIROR
 <213> Матрица нуклеотидов
 <220>
 <223> VH-сегмент анти-ULL4 антитела E9.5E
 <400> 184

Glu Val Glu Leu Glu 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 Glu 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 Glu 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 Glu Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 185
<211> 7
<212> EIDOK
<213> Sequenza non identificata

<220>
<223> CDR-H1 anti-DLL4 anticorpo E9.5E

<400> 185

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 186
<211> 16
<212> EIDOK
<213> Sequenza non identificata

<220>
<223> CDR-H2 anti-DLL4 anticorpo 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> 31
<212> EIDOK
<213> Sequenza non identificata

<220>
<223> CDR-H3 anti-DLL4 anticorpo E9.5E

<400> 187

Gln Ser Val Pro Leu Gly Gly Gly Ala Asp Glu
1 5 10

<210> 188
<211> 121
<212> EIDOK
<213> Sequenza non identificata

<220>
<223> VH-connate anti-DLL4 anticorpo E9.10C

<400> 188

Gln Val Gln Leu Gln Gly Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
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 Gly Ser Asp Asn Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 188

<211> 7

<212> EISGR

<213> Научна новинарство

<220>

<221> CDR-H1 анти-CDL4 антитела B9.10C

<400> 189

Ser Gly Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 190

<211> 16

<212> EISGR

<213> Научна новинарство

<220>

<221> CDR-H2 анти-CDL4 антитела B9.10C

<400> 190

Asp His Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 191

<211> 11

<212> EISGR

<213> Научна новинарство

<220>

<221> CDR-H3 анти-CDL4 антитела B9.10C

<400> 191

Gln Ala Val Met Tyr Gly Gly Gly Ser Asp Asn
1 5 10

<210> 193

<211> 121

<212> BHHCK

<213> Myxma neomimosalet

<220>

<223> V8-α-macrom auto-BLL4 aspartic E9.7B

<400> 192

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys 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 Gln
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 Gln 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> BHHCK

<213> Myxma neomimosalet

<220>

<223> CDR-H1 auto-BLL4 aspartic E9.7B

<400> 193

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 194

<211> 16

<212> BHHCK

<213> Myxma neomimosalet

<220>

<223> CDR-H2 антит-ДЛЛ4 анттитина E9.7E

<400> 194

Asp Ile Tyr Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp
 1 5 10 15

<210> 195

<211> 11

<212> BLANK

<213> Боязнь неописуемая

<220>

<223> CDR-H3 антит-ДЛЛ4 анттитина E9.7E

<400> 195

Gln Asp Met Ile Leu Gly Gly Gly Ala Asp Asn
 1 5 10

<210> 196

<211> 121

<212> BLANK

<213> Боязнь неописуемая

<220>

<223> VH-связать антит-ДЛЛ4 анттитина E9.12B

<400> 196

Gln 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> 192
 <211> 7
 <212> EIDOK
 <213> Екучна дослідницька
 <220>
 <223> CDR-H1 анти-CD4 антитіла E9.12B
 <400> 197

Ser Ser Asn Tyr Tyr Trp Gly
 1 5

<210> 198
 <211> 16
 <212> EIDOK
 <213> Екучна дослідницька
 <220>
 <223> CDR-H2 анти-CD4 антитіла E9.12B
 <400> 198

Asp Glu Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 199
 <211> 11
 <212> EIDOK
 <213> Екучна дослідницька
 <220>
 <223> CDR-H3 анти-CD4 антитіла E9.12B
 <400> 199

Glu Ala Val Ser Phe Gly Gly Gly Ala Asp Ser
 1 5 10

<210> 200
 <211> 121
 <212> EIDOK
 <213> Екучна дослідницька
 <220>
 <223> VH-область анти-CD4 антитіла E9.10E
 <400> 200

Glu Val Glu Leu Glu 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 Glu 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

Gly Ala Arg Gln Asp Val Met Tyr Gly 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> BLANK

<213> Штука дослідження

<220>

<223> CDP-81 anti-BLL4 антитіла ES.10E

<400> 201

Ser Gly Asn Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 202

<211> 16

<212> BLANK

<213> Штука дослідження

<220>

<223> CDP-82 anti-BLL4 антитіла ES.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> BLANK

<213> Штука дослідження

<220>

<223> CDP-83 anti-BLL4 антитіла ES.10E

<400> 203

Gln Asp Val Met Tyr Gly Gly Gly Gly Asp Ser
1 5 10

<400> 206

Asp Ile Asn Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
 1 5 10 15

<210> 207

<211> 11

<212> BLPCR

<213> Вспышка рецидивности

<220>

<223> CDR-H3 anti-HEL4 субтитра E9.6A

<400> 207

Glu Ala Val Ala Leu Gly Gly Gly Ala Asp Ser
 1 5 10

<210> 208

<211> 121

<212> BLPCR

<213> Вспышка рецидивности

<220>

<223> VH-область анти-HEL4 субтитра E9.7A

<400> 208

Glu Val Glu Leu Glu 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 Asn Glu Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Asn Tyr Ala Gly Cys Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Glu 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 Gly Ala Asp Leu Trp Gly
 100 105 110

Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 209

<211> 7

<212> BIRCK
 <213> Научна дослідницька

<220>
 <223> CD8-H1 анти-CDL4 антитіла E9.7A
 <400> 209

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
 1 5

<210> 210
 <211> 16
 <212> BIRCK
 <213> Научна дослідницька

<220>
 <223> CD8-H2 анти-CDL4 антитіла E9.7A
 <400> 210

Asp Ile Met Tyr Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 211
 <211> 11
 <212> BIRCK
 <213> Научна дослідницька

<220>
 <223> CD8-H3 анти-CDL4 антитіла E9.7A
 <400> 211

Glu Asp Val Lys Phe Gly Gly Gly Ala Asp Leu
 1 5 10

<210> 212
 <211> 121
 <212> BIRCK
 <213> Научна дослідницька

<220>
 <223> VH-область анти-CDL4 антитіла E9.8A
 <400> 212

Gln Val Gln Leu Gln Gln 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 Gln 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> B130K
<213> Научна дослідницька

<220>
<221> CDR-H1 anti-DLL4 sequence E9.88

<400> 213

Ser Gly Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 214
<211> 16
<212> B130K
<213> Научна дослідницька

<220>
<221> CDR-H2 anti-DLL4 sequence E9.88

<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> B130K
<213> Научна дослідницька

<220>
<221> CDR-H3 anti-DLL4 sequence E9.88

<400> 215

Glu Ser Val Pro Leu Gly Gly Gly Ala Asp Asn
1 5 10

<210> 216
<211> 104
<212> B130K
<213> Научна дослідницька

<220>

<221> VI-CHARGE arm-BLL4 argentina E9.13

<400> 216

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 Thr 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 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> 217

<211> 11

<212> BLISK

<213> Myxoma neochlamis

<220>

<221> CUP-L1 arm-BLL4 argentina E9.13

<400> 217

Ser Gly Asp Thr Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 218

<211> 7

<212> BLISK

<213> Myxoma neochlamis

<220>

<221> CUP-L2 arm-BLL4 argentina E9.13

<400> 218

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser
 1 5

<210> 219

<211> 9

<212> BIRCK
 <213> Broyana noonimoshikta
 <220>
 <223> CGR-L3 sams-DLL4 sntutina 69.13
 <400> 219

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val
 1 5

<210> 220
 <211> 106
 <212> BIRCK
 <213> Broyana noonimoshikta
 <220>
 <223> VL-odnarta sams-DLL4 sntutina 69.16
 <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 Glu 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

Asp 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> BIRCK
 <213> Broyana noonimoshikta

<220>
 <223> CGR-L1 sams-DLL4 sntutina 69.16
 <400> 221

Ser Gly Glu Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 222
 <211> 7
 <212> B100K
 <213> *Escherichia coli*
 <220>
 <223> CDR-L2 anti-CD4 antibody E9.16
 <400> 222
 Glu Asp Phe Lys Arg Pro Ser
 1 5

 <210> 223
 <211> 9
 <212> B100K
 <213> *Escherichia coli*
 <220>
 <223> CDR-L3 anti-CD4 antibody E9.16
 <400> 223
 Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
 1 6

 <210> 224
 <211> 106
 <212> B100K
 <213> *Escherichia coli*
 <220>
 <223> VL-область анти-CD4 антитела E9.38
 <400> 224
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Glu
 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 Glu Glu 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> EINDK
 <213> Бывшая последовательность
 <220>
 <223> CDR-L1 анти-CDL4 антимамина E9.38
 <400> 225

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 226
 <211> 7
 <212> EINDK
 <213> Бывшая последовательность
 <220>
 <223> CDR-L2 анти-CDL4 антимамина E9.38
 <400> 226

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 227
 <211> 9
 <212> EINDK
 <213> Бывшая последовательность
 <220>
 <223> CDR-L3 анти-CDL4 антимамина E9.38
 <400> 227

Gln Ala Tyr Asp Arg Asp Val Gly Val
 1 5

<210> 228
 <211> 108
 <212> EINDK
 <213> Бывшая последовательность
 <220>
 <223> VL-соединение анти-CDL4 антимамина E9.4
 <400> 228

Ser Tyr Gln 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 Asp 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 Glu Pro Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu 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> BIRCK

<213> Myxoma monstrosus

<220>

<223> CDR-L1 anti-DLL4 antibody ES.4

<400> 229

Ser Gly Glu Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 230

<211> 7

<212> BIRCK

<213> Myxoma monstrosus

<220>

<223> CDR-L2 anti-DLL4 antibody ES.4

<400> 230

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 231

<211> 8

<212> BIRCK

<213> Myxoma monstrosus

<220>

<223> CDR-L3 anti-DLL4 antibody ES.4

<400> 231

Glu Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
1 5

<210> 232

<211> 106

<212> BIRCK

<213> Myxoma monstrosus

<210>

<223> VL-CDRalpha2 anti-GM4 antiserum E9.11

<400> 232

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 Asp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln 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 Gln 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> 233

<211> 11

<212> EISOK

<213> Erythra neocladonigra

<220>

<223> CDR-L1 anti-GM4 antiserum E9.11

<400> 233

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
 1 5 10

<210> 234

<211> 7

<212> EISOK

<213> Erythra neocladonigra

<220>

<223> CDR-L2 anti-GM4 antiserum E9.11

<400> 234

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 235

<211> 9

<212> SIBOK

<213> *Myxma neochlorotica*

<220>

<223> CDB-13 anti-BLL4 antisera ES.11

<400> 235

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val

1 5

<210> 236

<211> 104

<212> SIBOK

<213> *Myxma neochlorotica*

<220>

<223> VL-060000 anti-BLL4 antisera ES.14

<400> 236

Ser Tyr Gln Leu Thr Gln Pro Ser 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

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asp Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met

65 70 75 80

Asp Gln 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> 237

<211> 11

<212> SIBOK

<213> *Myxma neochlorotica*

<220>

<223> CDB-13 anti-BLL4 antisera ES.14

<400> 237

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 238
 <211> ?
 <212> BLOCK
 <213> Блок нечисловых
 <220>
 <221> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E3.14

<400> 238

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 239
 <211> ?
 <212> BLOCK
 <213> Блок нечисловых
 <220>
 <221> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E3.14

<400> 239

Glu Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
 1 5

<210> 240
 <211> 108
 <212> BLOCK
 <213> Блок нечисловых
 <220>
 <221> VL-область анти-DLL4 антитела E3.17

<400> 240

Ser Tyr Glu Leu Thr Glu 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 Glu 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 Glu 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> EISECK
 <213> Erythra hochmossliche

<220>
 <223> CDR-L3 anti-DLL4 antiserum ES.17

<400> 241

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
 1 5 10

<210> 242
 <211> 7
 <212> EISECK
 <213> Erythra hochmossliche

<220>
 <223> CDR-L2 anti-DLL4 antiserum ES.17

<400> 242

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 243
 <211> 9
 <212> EISECK
 <213> Erythra hochmossliche

<220>
 <223> CDR-L3 anti-DLL4 antiserum ES.17

<400> 243

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
 1 5

<210> 244
 <211> 106
 <212> EISECK
 <213> Erythra hochmossliche

<220>
 <223> VL-CD3a anti-DLL4 antiserum ES.18

<400> 244

Ser Tyr Gln 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 Glu Pro Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu 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> EINHOK

<213> Структа неопределенная

<220>

<221> CDR-L1 анти-DLL4 антитела E9.18

<400> 245

Ser Gly Glu Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
 1 5 10

<210> 246

<211> 7

<212> EINHOK

<213> Структа неопределенная

<220>

<221> CDR-L2 анти-DLL4 антитела E9.18

<400> 246

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 247

<211> 9

<212> EINHOK

<213> Структа неопределенная

<220>

<221> CDR-L3 анти-DLL4 антитела E9.18

<400> 247

Glu Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
 1 5

<210> 248

<211> 106

<212> EINHOK

<213> Структа неопределенная

<220>

<221> VL-cDNA от анки-III4 анкирина E9.19

<400> 248

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 Glu 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> 249

<211> 11

<212> EEFGR

<213> Erythrae noctuides

<220>

<221> CDE-11 анки-III4 анкирина E9.19

<400> 249

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
 1 5 10

<210> 250

<211> 7

<212> EEFGR

<213> Erythrae noctuides

<220>

<221> CDE-12 анки-III4 анкирина E9.19

<400> 250

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 251

<211> 8

<212> EIDOK
 <213> Eryuna nochinowicow
 <220>
 <223> CDR-L3 anti-DLL4 antymina 89.19
 <400> 251

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
 1 5

<210> 252
 <211> 196
 <212> EIDOK
 <213> Eryuna nochinowicow

<220>
 <223> VL-pobawox anti-DLL4 antymina 89.22
 <400> 252

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

Glu Asp Ser Lys Arg Phe Ser Gly Ile Pro Gln 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> 253
 <211> 11
 <212> EIDOK
 <213> Eryuna nochinowicow

<220>
 <223> CDR-L1 anti-DLL4 antymina 89.22
 <400> 253

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
 1 5 10

<210> 254
 <211> 7
 <212> BL50K
 <213> Брыуна нондигондига
 <220>
 <223> CDS-L2 амтн-DLL4 антитина 89.22
 <400> 254

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 255
 <211> 9
 <212> BL50K
 <213> Брыуна нондигондига
 <220>
 <223> CDS-L3 амтн-DLL4 антитина 89.22
 <400> 255

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
 1 5

<210> 256
 <211> 106
 <212> BL50K
 <213> Брыуна нондигондига
 <220>
 <223> VL-ошарта амтн-DLL4 антитина 89.48
 <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> E180K
 <213> Струна посидовниста

<220>
 <223> CUB-11 anti-DLL4 antibody E9.48

<400> 257

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
 1 5 10

<210> 258
 <211> 7
 <212> E180K
 <213> Струна посидовниста

<220>
 <223> CUB-12 anti-DLL4 antibody E9.48

<400> 258

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 259
 <211> 9
 <212> E180K
 <213> Струна посидовниста

<220>
 <223> CUB-13 anti-DLL4 antibody E9.48

<400> 259

Glu Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
 1 5

<210> 260
 <211> 106
 <212> E180K
 <213> Струна посидовниста

<220>
 <223> V1-000000 anti-DLL4 antibody 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 Glu Pro Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu 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> EIDCK
 <213> Erythra neocinnamoyl

<220>
 <223> CDR-L1 anti-DLL4 antibody E9.65
 <400> 261

Ser Gly Glu Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
 1 5 10

<210> 262
 <211> 7
 <212> EIDCK
 <213> Erythra neocinnamoyl

<220>
 <223> CDR-L2 anti-DLL4 antibody E9.65
 <400> 262

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 263
 <211> 9
 <212> EIDCK
 <213> Erythra neocinnamoyl

<220>
 <223> CDR-L3 anti-DLL4 antibody E9.65
 <400> 263

Glu Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
 1 5

<210> 264
 <211> 105
 <212> EIDCK
 <213> Erythra neocinnamoyl

<210>

<211> VL-CDHAc78L swap-DLL4 sequence E9.65

<400> 264

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 Glu 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> 265

<211> 11

<212> XINCK

<213> Myxoma neochimicae

<220>

<221> CDR-L1 swap-DLL4 sequence E9.66

<400> 265

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
 1 5 10

<210> 266

<211> 7

<212> XINCK

<213> Myxoma neochimicae

<220>

<221> CDR-L2 swap-DLL4 sequence E9.66

<400> 266

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 267

<211> 9

<212> B100K
 <213> Wryana nochinashieri
 <220>
 <223> CDR-L3 anti-CD14 antiserum E9.68
 <400> 267

Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
 1 5

<210> 268
 <211> 106
 <212> B100K
 <213> Wryana nochinashieri
 <220>
 <223> VL-020402 anti-CD14 antiserum 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 Asp 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 Thr 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

Thr Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 269
 <211> 11
 <212> B100K
 <213> Wryana nochinashieri
 <220>
 <223> CDR-L1 anti-CD14 antiserum E9.71
 <400> 269

Ser Gly Gln Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
 1 5 10

<210> 270
 <211> ?
 <212> BLNOK
 <213> Hryana hochishenslora
 <220>
 <223> CDR-L2 anti-BLL4 antytilna E9.71
 <400> 270

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 271
 <211> ?
 <212> BLNOK
 <213> Hryana hochishenslora
 <220>
 <223> CDR-L3 anti-BLL4 antytilna E9.71
 <400> 271

Glu Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
 1 5

<210> 272
 <211> 108
 <212> BLNOK
 <213> Hryana hochishenslora
 <220>
 <223> VL-odnacha anti-BLL4 serotipna E9.28
 <400> 272

Ser Tyr Glu Leu Thr Glu Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Glu
 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 Ser 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> EIDCK
 <213> Брына пачинаецца
 <220>
 <223> CDR-L1 антэ-DLL4 антэзіна ES.2B
 <400> 273

Ser Gly Glu Gly Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 274
 <211> 7
 <212> EIDCK
 <213> Брына пачинаецца
 <220>
 <223> CDR-L2 антэ-DLL4 антэзіна ES.2B
 <400> 274

Glu Asp Ser Thr Arg Pro Ser
 1 5

<210> 275
 <211> 9
 <212> EIDCK
 <213> Брына пачинаецца
 <220>
 <223> CDR-L3 антэ-DLL4 антэзіна ES.2B
 <400> 275

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val
 1 5

<210> 276
 <211> 136
 <212> EIDCK
 <213> Брына пачинаецца
 <220>
 <223> VL-эпітэп антэ-DLL4 антэзіна ES.1F
 <400> 276

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 Phe Ser Gly Ile Phe Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Val Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Arg Tyr Tyr Cys Glu Ala Trp Asp Met Glu Ala Gly Val
85 90 95

Pro Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 100

<210> 277
<214> 11
<212> БИОС
<213> Наука и исследования

<20>
<22> CBR-11 anti-GL4 antitoxin B9.1F
<400> 277

Ser Gly Asp Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 278
<211> 7
<212> КЛАСК
<213> Струна познанајеице

<228>
<229> CDR-12 anti-GLA antigen B9.1F
<230> 278

Slu	Asp	Ger	Slu	Ang	Den	Ger
1			8			

<210> 273
<211> 3
<212> BINGX
<213> Ныгуна тоолмолук.

<220>
<223> C08-L3 germ-DLL4 annexin E3.1F
<400> 279

Gln Ala Trp Asp Met Gln Ala Gly Val
1 5

<210> 280
<211> 104
<212> ERROR
<213> Erythraeae postrigensicola

<220>

<223> VL-odnosa antu-BLL4 antena E9.10C

<400> 280

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 Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val
20 25 30

Ser Trp Tyr Glu 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 Thr Gly Val
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr
100

<210> 281

<211> 11

<212> BL00K

<213> Eryuna podniznitsa

<220>

<223> CDR-L1 antu-BLL4 antena E9.10C

<400> 281

Ser Gly Asp Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 282

<211> 7

<212> BL00K

<213> Eryuna podniznitsa

<220>

<223> CDR-L2 antu-BLL4 antena E9.10C

<400> 282

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser
1 5

<210> 283

<211> 3

<212> B180K
 <213> Bryonia occidentalis
 <220>
 <223> CDS-L3 anti-BLL4 antisense 89.10E
 <400> 283

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val
 1 5

<210> 284
 <211> 104
 <212> B180K
 <213> Bryonia occidentalis
 <220>
 <223> VL-eGluacta anti-BLL4 antisense 89.10E
 <400> 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 Glu 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> 285
 <211> 11
 <212> B180K
 <213> Bryonia occidentalis

<220>
 <223> CDS-L1 anti-BLL4 antisense 89.10E
 <400> 285

Ser Gly Glu Gly Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 286
 <211> 7
 <212> EINH
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> CDB-L3 анти-DLL4 антитіло E9.10E
 <400> 286

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser
 1 5

<210> 287
 <211> 8
 <212> EINH
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> CDB-L3 анти-DLL4 антитіло E9.10E
 <400> 287

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Ala Gly Val
 1 5

<210> 288
 <211> 104
 <212> EINH
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> VL-область анти-DLL4 антитіла 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> EINHOK
 <213> Базуна дослідження

<220>
 <223> CDB-L1 антитіло-CD14 антитіло E9.7E

<400> 289

Ser Gly Asp Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 290
 <211> 7
 <212> EINHOK
 <213> Базуна дослідження

<220>
 <223> CDB-L2 антитіло-CD14 антитіло E9.7E

<400> 290

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser
 1 5

<210> 291
 <211> 8
 <212> EINHOK
 <213> Базуна дослідження

<220>
 <223> CDB-L3 антитіло-CD14 антитіло E9.7E

<400> 291

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Ala Gly Val
 1 5

<210> 292
 <211> 104
 <212> EINHOK
 <213> Базуна дослідження

<220>
 <223> VL-область антитіло-CD14 антитіло E9.5E

<400> 292

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 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 Glu Phe 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> BLAST
 <213> Myxoma haemorrhagica

<220>
 <221> CDR-L1 anti-DLL4 antibody E9.5E

<400> 293

Ser Gly Asp Met Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 294
 <211> 7
 <212> BLAST
 <213> Myxoma haemorrhagica

<220>
 <221> CDR-L2 anti-DLL4 antibody E9.5E

<400> 294

Glu Asp Ser Glu Arg Pro Ser
 1 5

<210> 295
 <211> 3
 <212> BLAST
 <213> Myxoma haemorrhagica

<220>
 <221> CDR-L3 anti-DLL4 antibody E9.5E

<400> 295

Glu Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val
 1 5

<210> 296
 <211> 104
 <212> BLAST
 <213> Myxoma haemorrhagica

<220>

<223> VL-cDnaCDB-anti-DLL4 antibody E9.12B

<400> 296

Ser Tyr Gln Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 13

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp 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

Gln Asp Ser Thr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Thr Ser Gly Thr Gln Pro Met
 65 70 75 80

Asp Gln Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Gly Val
 85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr
 100

<210> 297

<211> 11

<213> BLINK

<213> Remyxa oceanosolens

<220>

<223> CDR-L1 anti-DLL4 antibody E9.12B

<400> 297

Ser Gly Asp Gly Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 298

<211> 7

<213> BLINK

<213> Remyxa oceanosolens

<220>

<223> CDR-L2 anti-DLL4 antibody E9.12B

<400> 298

Gln Asp Ser Thr Arg Pro Ser
 1 5

<210> 299

<211> 9

<212> E190K

<213> Вступна послідовність

<220>

<223> CGP-13 анті-CD14 антитіла E9.128

<400> 299

Gln Ala Trp Asp Ser Gly Ser Gly Val

1 5

<210> 300

<211> 104

<212> E190K

<213> Вступна послідовність

<220>

<223> VL-содержащий анти-CD14 антитіла E9.108

<400> 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 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu 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 Arg 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 Gly Glu Thr Gly Val

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr

100

<210> 301

<211> 11

<212> E190K

<213> Вступна послідовність

<220>

<223> CDK-L1 анті-CD14 антитіла E9.108

<400> 301

Ser Gly Glu Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 302
 <211> 1
 <212> BIFOK
 <213> *Trypana neochimica*
 <220>
 <223> CDR-L3 sucr-BLL4 aspartina E9.10K
 <400> 302

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 303
 <211> 9
 <212> BIFOK
 <213> *Trypana neochimica*
 <220>
 <223> CDR-L3 sucr-BLL4 aspartina E9.10K
 <400> 303

Glu Ala Thr Asp Gly Glu Thr Gly Val
 1 5

<210> 304
 <211> 104
 <212> BIFOK
 <213> *Trypana neochimica*
 <220>
 <223> VL-CDR3 sucr-BLL4 aspartina E9.66
 <400> 304

Ser Tyr Glu Leu Thr Glu Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Glu
 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 Glu Glu Lys Pro Gly Glu 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 Glu Ala Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu 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> BIRGH
 <213> Bryana nechinensis

<220>
 <223> CDR-L1 anti-BLL4 antigen ES.6A
 <400> 305

Ser Gly Asp Met Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 306
 <211> 7
 <212> BIRGH
 <213> Bryana nechinensis

<220>
 <223> CDR-L2 anti-BLL4 antigen ES.6A
 <400> 306

Glu Asp Thr Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 307
 <211> 9
 <212> BIRGH
 <213> Bryana nechinensis

<220>
 <223> CDR-L3 anti-BLL4 antigen ES.6A
 <400> 307

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Thr Gly Val
 1 5

<210> 308
 <211> 104
 <212> BIRGH
 <213> Bryana nechinensis

<220>
 <223> VL-CD34/CD3 anti-BLL4 antigen ES.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 Glu Lys Pro Gly Glu Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Gln Asp Ala Met Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Thr 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> EISOK
 <213> Eryuna nochinoshiora

<220>
 <221> CDR-L1 amino-DLL4 antiserum E9.7A

<400> 309

Ser Gly Glu Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 310
 <211> 7
 <212> EISOK
 <213> Eryuna nochinoshiora

<220>
 <221> CDR-L2 amino-DLL4 antiserum E9.7A

<400> 310

Gln Asp Ala Met Arg Pro Ser
 1 5

<210> 311
 <211> 3
 <212> EISOK
 <213> Eryuna nochinoshiora

<220>
 <221> CDR-L3 amino-DLL4 antiserum E9.7A

<400> 311

Gln Ala Trp Asp Met Glu Thr Gly Val
 1 5

<210> 312
 <211> 104
 <212> EISOK
 <213> Eryuna nochinoshiora

<220>

<223> VL-288accr auto-BLL4 americana E2.8H

<400> 312

Ser Tyr Gln 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 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 Ser Met Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asp Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
 65 70 75 80

Asp Gln Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Val Gly Val
 85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr
 100

<210> 313

<211> 11

<212> B18CK

<213> Myxma rodinonolara

<220>

<223> COR-11 auto-BLL4 americana E2.8H

<400> 313

Ser Gly Gln Ser Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 314

<211> 2

<212> B18CK

<213> Myxma rodinonolara

<220>

<223> COR-12 auto-BLL4 americana E2.8H

<400> 314

Gln Asp Ser Met Arg Pro Ser
 1 5

<210> 315

<211> 3

<212> BIROK

<213> Eryuma nochimoshiketa

<220>

<223> CDA-L3 anti-DLL4 antibody E9.8H

<400> 315

Gln Ala Trp Asp Ser Glu Val Gly Val

1 5

<210> 316

<211> 119

<212> BIROK

<213> Eryuma nochimoshiketa

<220>

<223> VH-006005 anti-DLL4 antibody 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 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> BIROK

<213> Eryuma nochimoshiketa

<220>

<223> VH-006005 anti-DLL4 antibody A10.R30

<400> 317

Gln Val Gln Leu Val Gln 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 His Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ala Gly 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> BHHOK

<213> *Myxma neohispanica*

<220>

<223> VN-GGasec Sertr-DLL4 aneurins A10.R42

<400> 318

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly 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 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> BLANK
<213> Бывшая неопознана

<220>
<221> VH-сегмента антител-DLL4 антигена A10.98

<400> 319

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 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 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> BLANK
<213> Бывшая неопознана

<220>
<221> VH-сегмента антител-DLL4 антигена A10.98

<400> 320

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 Glu 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 Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys His Gly Gly Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 321

<211> 119

<212> BLAST

<213> *Bryana noctigallina*

<220>

<221> VN-cysteine asen-GLA serine A10.1A

<400> 321

Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Glu 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 Glu 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 Glu 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> BIRCK
<213> Bryana acchilomacra

<220>
<223> VN-Genbank entry-GBL4 americana A10.35

<400> 322

Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly 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 Gln Trp Val
35 40 45

Glu 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 Asp 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

Glu 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> BIRCK
<213> Bryana acchilomacra

<220>
<223> VN-Genbank entry-GBL4 americana A10.3A

<400> 323

Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 325
<211> 119
<212> EINHOK
<213> Метрине посливоениот

<220>
<223> VH-областа анки-DR14 анкилина A10.3D

<400> 125

Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Glu 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 Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asp Ile Ser Glu 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 Glu 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 Glu Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 326
<211> 119
<212> EINHOK
<213> Метрине посливоениот

<220>
<223> VH-областа анки-DR14 анкилина A10.3C

<400> 126

Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Glu 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 Gln 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 Gly Asn Val Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<216> 327

<211> 196

<212> BLHOK

<213> Myxma nomenclatura

<220>

<223> VL-ocnacta sssu-BLL4 sssuina A10.3

<440> 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 Gly 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 Glu Ser Trp Asp Arg Ser Asp Val Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 328
 <211> 106
 <212> SIMON
 <213> *Styena neomimasieta*
 <220>
 <223> VL-сбсакъ ахх-GLI4 ауауаа А10.141
 <400> 328
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Phe 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 Phe 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 Ser
 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> SIMON
 <213> *Styena neomimasieta*
 <220>
 <223> VL-сбсакъ ауау-GLI4 ауауаа А10.173
 <400> 329
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Phe Ser Val Ser Val Ser Phe 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 Phe 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 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 330

<211> 106

<212> HYPGE

<213> Жгутика постинковичей

<220>

<223> VL-область антител-DLL4 антигена A10.38

<400> 336

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 Glu 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 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 331

<211> 106

<212> HYPGE

<213> Жгутика постинковичей

<220>

<223> VL-область антител-DLL4 антигена A10.68

<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 Glu Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Gly Met Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln 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> B1HDX

<213> *Esyuna neocinasiana*

<220>

<223> VI-cDNAseqs anti-GLLA aurumina 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 Glu Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Gly Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln 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

<212> B120K

<213> Eryuna neohindusmicro

<220>

<221> VL-odnacta suwa-DLL4 antwina A10.4C

<400> 333

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Glu
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 Glu 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

<210> 334

<211> 121

<212> B120K

<213> Eryuna neohindusmicro

<220>

<221> VH-odnacta suwa-DLL4 antwina E9.1

<400> 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
65 86 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
		119					120	

4216 335

1212 103

210 2100X

✓2134 *Myrica monacensis*

2002

<223> VL-phenanthrene anthr-DLL4 anthracene 49.1

490 335

Ser Tyr Glu Leu Thr Glu Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 75 80

Ser Trp Tyr Glu Glu Lys Pro Gly Glu 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 35 60

Asp Ser Gly Arg Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly Val
85 90 95

Pro Gly Tyr Gly Thr Arg Val Thr Val Leu Gly
100 100

210 336

520 128

Q124 8105X

4230 *Myrica neomexicana*

2022

<223> V8-00nacra: sacre-01114 sacrasina 88-361

400 336

Glu Val Glu Leu Val Gly Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly
1 5 10 15

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 339

<211> 121

<212> BIRNOK

<213> Bryonia nuchinoscapula

<220>

<223> VH-cGAScan swrn-DLL4 antwaina E9-SE2

<400> 339

Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln
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 Gln Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gln 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> BIRNOK

<213> Bryonia nuchinoscapula

<220>

<223> VH-cGAScan swrn-DLL4 antwaina E9-SE2

<400> 339

Ser Tyr Gln 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 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> 143

<211> 107

<212> SIBOK

<213> Bryana hochhausiana

<220>

<223> VL-055acta astru-GLL4 americana E9-384

<400> 143

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

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Thr Pro Gln 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 Gln 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> 144

<211> 121

<212> SIBOK

<213> Bryana hochhausiana

<220>

<223> VH-055acta astru-GLL4 americana E9-385

<400> 144

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys 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> BLUOK

<213> Eryena nomenclatura

<220>

<223> VL-ocnara sara-BLL4 sarrina EP-SER

<400> 345

Gln Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Gln 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 Gln 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 Gln Ala
65 70 75 80

Gln Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Arg Asp Thr Gly
85 90 95

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln 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 Gln 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> 349

<211> 121

<212> SIKOK

<213> Bryopsis neochinosmicos

<220>

<221> VM-060acc6 swrm-GILL4 antherina ES-3E7

<400> 349

Glu Val Gln Leu Val Gln 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 Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln
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 Gln Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gln 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

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> EINHOK

<213> Erythra nechinopsicola

<210>

<213> VL-038acm. aum-ULL4 asustica E9-353

<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 Gln Ile Lys Arg
 100 105

<210> 352

<211> 121

<212> EINHOK

<213> Erythra nechinopsicola

<210>

<213> VL-038acm. aum-ULL4 asustica E9-353

<400> 352

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Thr Gln 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 Asp 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 Gln 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> BLINK

<213> Bryana neocinoblasta

<220>

<221> VL-omacris awan-BHB4 awanawina ES-FWI

<400> 351

Glu Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Gln 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

Gln 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 Gln Ile Lys Arg
100 105

<210> 354

<211> 121

<212> SIKON

<213> Bryana neozinensis

<220>

<223> VL-c8ncscn answ-DLL4 answrins E9-FR2

<400> 354

Gln Val Thr Leu Arg Gln 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 Gln
35 40 45

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asp 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 Ser Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gln 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> SIKON

<213> Bryana neozinensis

<220>

<223> VL-c8ncscn answ-DLL4 answrins E9-FR2

<400> 355

Asp Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln 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 Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile His 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 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 356

<211> 121

<212> B1H0K

<213> Мрыуна ноднамаиока

<220>

<223> VH-синарн антк-СН4 антмина 89.71

<400> 356

Glu Val Gln Leu Gln Gln 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> 357

<211> 167

<212> S1HOK

<213> Hxywss mcdmssuicss

<220>

<223> VL-pDnacta mcdm-BLL4 amwrlms E3.71

<400> 357

Ser Tyr Gln 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

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Arg Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met
 65 70 75 80

Asp Gln Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Tyr Asp Arg Asp Thr Gly Val
 85 90 95

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105

<210> 358

<211> 121

<212> S1HOK

<213> Hxywss mcdmssuicss

<220>

<223> VH-pDnacta mcdm-BLL4 amwrlms E3.71(M)

<400> 358

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys 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 Gln
 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> BL60K

<213> Myxoma moniliomycetes

<220>

<223> VL-объекты анки-DLL4 антитела ES.71(N)

<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 Glu 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> BL60K

<213> Myxoma moniliomycetes

<220>

<223> VL-объекты анки-DLL4 антитела ES.71(L)

<400> 360

Gln 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 Gln
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 Gly Ser Asp Lys Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 361

<211> 197

<212> EINHOK

<213> Eaywaa nooninonniote

<220>

<223> VL-36naccu aaru-3LL4 Eaywaa E9.01(D)

<230> 361

Ser Tyr Gln 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

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gln 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

Glu Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 362
<211> 19
<212> BLOCK
<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> BLOCK
<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> BLOCK
<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> BLOCK
<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> EIRCK
 <213> Homo sapiens

<400> 366

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
 20

<210> 367
 <211> 22
 <212> EIRCK
 <213> Homo sapiens

<400> 367

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
 20

<210> 368
 <211> 30
 <212> EIRCK
 <213> Штука неопределенная

<220>
 <223> Сайт розмешення антигена 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> EIRCK
 <213> Штука неопределенная

<220>
 <223> Сайт розмешення антигена 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> B1H0K
 <213> Bpyma nocnagocnacta

<220>
 <223> Caŝp poŝeŝennennŝ sŝennina E9.71(M)-2

<400> 370

Met Ala Trp Thr Pro Leu 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> B1H0K
 <213> Bpyma nocnagocnacta

<220>
 <223> Caŝp poŝeŝennennŝ antuŝina E9.71(M)-3

<400> 371

Met Ala Trp Thr Pro Leu 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> B1H0K
 <213> Bpyma nocnagocnacta

<220>
 <223> Caŝp poŝeŝennennŝ akurŝina E9.71(N)-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 Glu Pro Pro Ser Val
 20 25 30

Ser

<210> 373
 <211> 32
 <212> B1H0K
 <213> Bpyma nocnagocnacta

<220>
 <223> Сафіт розв'язування антитіла E3.71(M)-5
 <400> 373
 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 Tyr Gln Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser
 20 25 30

<210> 374
 <211> 4
 <212> EISCK
 <213> Ступінь послідовності
 <220>
 <223> Локалізація пептиду в CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3) .. (3)
 <223> X може являти собою будь-яку амінокислоту

<400> 374
 Phe Gly Xaa Gly
 1

<210> 375
 <211> 9
 <212> EISCK
 <213> Ступінь послідовності
 <220>
 <223> Локалізація пептиду в CDR

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (5)
 <223> X може являти собою будь-яку амінокислоту в положеннях 2-5

<400> 375
 Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 376
 <211> 5
 <212> EISCK
 <213> Ступінь послідовності
 <220>
 <223> Локалізація пептиду в CDR

<400> 376

Leu Glu Trp Ile Gly

1 5

<210> 377

<211> 4

<212> NIDOK

<213> Штучна умовленість

<220>

<221> Показує зв'язок між амінокислотами

<222>

<223> NIDOK

<224> (3) - (3)

<225> X може замінювати собі будь-яку амінокислоту

<400> 377

Trp Gly Xaa Gly

1