



(51) МПК  
*С07К 16/22* (2006.01)  
*С12Р 21/08* (2006.01)  
*А61К 39/395* (2006.01)  
*А61Р 37/00* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **СКОРРЕКТИРОВАННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

Примечание: библиография отражает состояние при переиздании

(21)(22) Заявка: 2011102583/10, 25.06.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 25.06.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
 25.06.2008 US 61/075,697;  
 25.06.2008 US 61/075,692;  
 25.06.2008 US 61/133,212;  
 24.02.2009 US 61/155,041

(43) Дата публикации заявки: 27.07.2012 Бюл. № 21

(45) Опубликовано: 20.10.2014

(15) Информация о коррекции:  
 Версия коррекции №1 (W1 C2)

(48) Коррекция опубликована:  
 10.04.2015 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SOPHIA RAN and CARLA MOUTA-BELLUM "Generation of new rabbit monoclonal antibody RAM-1 against human VEGF-C", Proc Amer Assoc Cancer Res, Volume 46, 2005, abstract. (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 25.01.2011

(86) Заявка РСТ:  
 СН 2009/000220 (25.06.2009)

(87) Публикация заявки РСТ:  
 ВО 2009/155724 (30.12.2009)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул.Б.Спасская, 25, строение 3,  
 ООО "Юридическая фирма Городисский и  
 Партнеры", пат.пов. А.В.Миц, рег. N 364

(72) Автор(ы):

**БОРРАС, Леонардо (СН),**  
**УРЕХ Дэвид (СН),**  
**ГУНДЕ, Теа (СН)**

(73) Патентообладатель(и):

**ИЭсБиЭйТек, эн Алькон Байомедикал**  
**Рисерч Юнит ЭлЭлСи (СН)**

RU 2 531 523 C9

RU 2 531 523 C9

(54) **СТАБИЛЬНЫЕ И РАСТВОРИМЫЕ АНТИТЕЛА, ИНГИБИРУЮЩИЕ VEGF**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области иммунологии и биотехнологии. Представлены

вариантные рекомбинантные антитела против VEGF человека, имеющие вариабельные области

тяжелой и легкой цепей, содержащие гипервариабельные участки (CDR) антител кролика. Также представлены: выделенные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие указанные антитела; вектор экспрессии, содержащий указанную молекулу нуклеиновой кислоты; и клетка-хозяин для экспрессии антитела по изобретению, содержащая указанный вектор

экспрессии. Описана фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество указанного антитела и фармацевтически приемлемый носитель. Изобретение позволяет расширить арсенал антител против VEGF человека, полученных от кролика. 7 н. и 17 з.п. ф-лы, 15 ил., 12 табл., 7 пр.

(56) (продолжение):

US 2003023046 A1, 30.01.2003. WO 2007019620 A1, 22.02.2007. MIKHAIL POPKOV, et al., "Human/mouse cross-reactive anti-VEGF receptor 2 recombinant antibodies selected from an immune b9 allotype rabbit antibody library", *Journal of Immunological Methods*, 288 (2004), pp. 149-164. А. РОЙТ и др. "Иммунология", Москва, "Мир", 2000, стр. 97-113

R U 2 5 3 1 5 2 3 C 9

R U 2 5 3 1 5 2 3 C 9



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 531 523**<sup>(13)</sup> **C9**

(51) Int. Cl.  
*C07K 16/22* (2006.01)  
*C12P 21/08* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 37/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

Note: Bibliography reflects the latest situation

(21)(22) Application: **2011102583/10, 25.06.2009**

(24) Effective date for property rights:  
**25.06.2009**

Priority:

(30) Convention priority:  
**25.06.2008 US 61/075,697;**  
**25.06.2008 US 61/075,692;**  
**25.06.2008 US 61/133,212;**  
**24.02.2009 US 61/155,041**

(43) Application published: **27.07.2012 Bull. № 21**

(45) Date of publication: **20.10.2014**

(15) Correction information:  
**Corrected version no1 (W1 C2)**

(48) Corrigendum issued on:  
**10.04.2015 Bull. № 10**

(85) Commencement of national phase: **25.01.2011**

(86) PCT application:  
**CH 2009/000220 (25.06.2009)**

(87) PCT publication:  
**WO 2009/155724 (30.12.2009)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul.B.Spasskaja, 25, stroenie 3, OOO  
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",  
pat.pov. A.V.Mits, reg.N 364**

(72) Inventor(s):

**BORRAS,Leonardo (CH),  
UREKKh Dehvid (CH),  
GUNDE,Tea (CH)**

(73) Proprietor(s):

**IEhsBiEhjTek, ehn Al'kon Bajomedikal Riserch  
Junit EhIEhlSi (CH)**

**RU 2 531 523 C 9**

**RU 2 531 523 C 9**

(54) **VEGF INHIBITING STABLE AND SOLUBLE ANTIBODIES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to immunology and biotechnology. There are presented version recombinant human VEGF antibodies containing variable regions of heavy and light chains containing complementarity-determining regions (CDR) of rabbit antibodies. There are also presented: recovered molecules of nucleic acids coding the above antibodies; an expression vector containing the above molecule of nucleic acid; and a

host cell for expression of the antibody according to the invention, containing the above expression vector. What is disclosed is a pharmaceutical composition containing a therapeutically effective amount of the above antibody and a pharmaceutically acceptable carrier.

EFFECT: invention enables extending the range of human VEGF antibodies recovered from a rabbit.

24 cl, 15 dwg, 12 tbl, 7 ex

**Релевантная информация**

По настоящей заявке испрашивается приоритет US 61/133212, поданной 25 июня 2008 года, US 61/075697, поданной 25 июня 2008 года, US 61/155041, поданной 24 февраля 2009 года и US 61/075692, поданной 25 июня 2008 года.

5 Содержания любых патентов, заявок на патент и ссылок, цитируемых в этом описании, включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

**Уровень техники**

Считается, что ангиогенез участвует в патогенезе различных нарушений, включая солидные опухоли, внутриглазные неоваскулярные синдромы, такие как  
 10 пролиферативные ретинопатии или возрастная дегенерация желтого пятна (AMD), ревматоидный артрит и псориаз (Folkman et al. J. Biol. Chem. 267:10931-10934 (1992); Klagsbrun et al. Annu. Rev. Physiol. 53:217-239 (1991); и Garner A, Vascular diseases. In: Pathobiology of ocular disease. A dynamic approach. Garner A, Klinrworth G K, Eds. 2nd Edition Marcel Dekker, NY, pp 1625-1710 (1994)). При солидных опухолях, ангиогенез и рост  
 15 новой сосудистой сети обеспечивает выживание опухоли, и между плотностью микрососудов в срезах опухолей и выживанием пациентов в случае рака молочной железы и других раковых опухолей была продемонстрирована четкая корреляция (Weidner et al. N Engl J Med 324:1-6 (1991); Horak et al. Lancet 340:1120-1124 (1992); и Macchiarini et al. Lancet 340: 145-146 (1992)).

Эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF) является известным регуляторным фактором ангиогенеза и неоваскуляризации, и было показано, что он является ключевым медиатором неоваскуляризации, связанной с опухолями и внутриглазными нарушениями (Ferrara et al. Endocr. Rev. 18:4-25 (1997)). мРНК VEGF сверхэкспрессируется во многих  
 20 опухолях человека, и концентрация VEGF в глазных жидкостях в высокой степени коррелируют с наличием активной пролиферации кровеносных сосудов у пациентов с  
 25 диабетической ретинопатией и другими связанными с ишемией ретинопатиями (Berkman et al., J Clin Invest 91:153-159 (1993); Brown et al. Human Pathol. 26:86-91 (1995); Brown et al. Cancer Res. 53:4727-4735 (1993); Mattern et al. Brit. J. Cancer. 73:931-934 (1996); и Dvorak et al. Am J. Pathol. 146:1029-1039 (1995); Aiello et al. N. Engl. J. Med. 331:1480-1487 (1994)).  
 30 Кроме того, недавние исследования показали наличие локализованного VEGF в хороидальных неоваскулярных мембранах у пациентов, пораженных AMD (Lopez et al. Invest. Ophtalmo. Vis. Sci. 37:855-868 (1996)). Нейтрализующие антитела против VEGF могут быть использованы для подавления роста различных линий опухолевых клеток человека у «голых» мышей, а также ингибирования внутриглазного ангиогенеза на  
 35 моделях ишемических ретинальных нарушений (Kim et al. Nature 362:841-844 (1993); Warren et al. J. Clin. Invest 95:1789-1797 (1995); Borgstrom et al. Cancer Res. 56:4032-4039 (1996); и Melnyk et al. Cancer Res. 56:921-924 (1996)) (Adamis et al. Arch. Ophthalmol. 114:66-71 (1996)).

Таким образом, существует потребность в моноклональных антителах против VEGF,  
 40 которые могут быть использованы для лечения солидных опухолей и различных неоваскулярных внутриглазных заболеваний.

**Сущность изобретения**

Настоящее изобретение относится к растворимым и стабильным анти-VEGF-иммуносвязывающим агентам, содержащим CDR моноклональных антител кролика.  
 45 Указанные антитела предназначены для диагностики и/или лечения VEGF-опосредованных нарушений. Также описаны гибридомы, нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева для экспрессии рекомбинантных антител по настоящему изобретению, способы их выделения и использование указанных антител в медицине.

**Краткое описание фигур**

Фиг.1 иллюстрирует кинетику связывания выбранных scFv с hVEGF<sub>165</sub> с

использованием Biacore (hVEGF<sub>165</sub>). Фиг.1а показывает данные, полученные для 511max: Ka (1/Ms): 6,59E+05; SE (ka): 1,10E+03; kd(1/s):4,40E-05; SE(kd):6,30E-07; KD(M):6,67E-11.

5 Фиг.1b показывает данные, полученные для 578max: Ka (1/Ms): 7,00E+05; SE (ka): 1,40E+03; kd(1/s): 3,07E-04; SE(kd): 8,50E-07; KD(M): 4,39E-10.

Фиг.2 иллюстрирует видоспецифичность, показывая кинетику связывания 578max с VEGF человека, мыши и крысы. Фиг.2а показывает данные, полученные для VEGF<sub>165</sub> человека: Ka (1/Ms): 7,00E+05; SE (ka): 1,40E+03; kd(1/s): 3,07E-04; SE(kd): 8,50E-07; KD (M): 4,39E-10. Фиг.2b показывает данные, полученные для VEGF<sub>164</sub> мыши: Ka (1/Ms): 1,03E+06; SE (ka): 2,30E+03; kd(1/s): 4,40E-04; SE(kd): 9,40E-07; KD(M): 4,29E-10. Фиг.2с показывает данные, полученные для VEGF<sub>164</sub> крысы: Ka (1/Ms): 8,83E+05; SE (ka): 2,50E+03; kd(1/s): 5,28E-04; SE(kd): 1,20E-06; KD(M): 5,98E-10.

10 Фиг.3 иллюстрирует кинетику связывания 578max с VEGF-изоформами (hVEGF<sub>121</sub> и hVEGF<sub>110</sub>). Фиг.3а показывает данные, полученные для VEGF<sub>165</sub> человека: Ka (1/Ms): 7,00E+05; SE (ka): 1,4E+03; kd(1/s): 3,07E-04; SE(kd): 8,50E-07; KD(M): 4,39E-10. Фиг.3b показывает данные, полученные для VEGF<sub>121</sub> человека: Ka (1/Ms): 5,87E+05; SE (ka): 1,20E+03; kd(1/s): 5,58E-04; SE(kd): 9,60E-07; KD(M): 9,50E-11. Фиг. 3с показывает данные, полученные для VEGF<sub>110</sub> человека: Ka (1/Ms): 5,23E+05; SE (ka): 1,30E+03; kd (1/s): 7,22E-04; SE(kd): 8,10E-07; KD(M): 1,38E-09.

Фиг.4 изображает кинетику связывания 578max, 578minmax и 578wt с hVEGF<sub>165</sub>.

Фиг.4а показывает данные, полученные для 578max: Ka (1/Ms): 7,00E+05; SE (ka): 1,40E+03; kd(1/s): 3,07E-04; SE(kd): 8,50E-07; KD(M): 4,39E-10. Фиг.4b показывает данные, полученные для 578minmax: Ka (1/Ms): 8,06E+05; SE (ka): 2,10E+03; kd(1/s): 5,04E-04; SE (kd): 1,10E-06; KD(M): 6,25E-10. Фиг.4с показывает данные, полученные для 578wt-His: Ka (1/Ms): 8,45E+05; SE (ka): 1,60E+03; kd(1/s): 1,69E-04; SE(kd): 7,60E-07; KD(M): 2,00E-10.

Фиг.5 иллюстрирует термическую стабильность 578max, 578minmax и 578minmax\_DHP (разворачивание, измеренное посредством FT-IR). Фиг.5а: 578minmax (ESBA903): T<sub>m</sub>=71,1°C; Фиг.5b: 578minmax\_DHP (#961): T<sub>m</sub>=70,2°C; Фиг.5с: 578max (#821): T<sub>m</sub>=70,4°C.

Фиг.6 иллюстрирует денатурацию и осаждение производных 578 после теплового стресса (фиг.6а: 50°C, фиг.6b: 60°C, фиг.6с: 70°C) в течение 30 минут.

Фиг.7 иллюстрирует растворимость 578max, 578minmax и 578minmax\_DHP (определяемую по осаждению сульфатом аммония). Фиг.7а: 578max (#821). V<sub>50</sub> был равен 27,24%. Фиг.7b: 578minmax (ESBA903). V<sub>50</sub> был равен 28,13. Фиг.7с: 578minmax\_DHP (#961). V<sub>50</sub> был равен 32,36%.

Фиг.8 иллюстрирует конкурентный ELISA VEGFR2 относительно HUVEC-анализа в качестве способов для измерения эффективности. Фиг.8а: Сравнение Lucentis и 511max (#802) в конкурентном ELISA VEGFR2. R<sup>2</sup> Lucentis: 0,9417; R<sup>2</sup> ESBA802: 0,9700. EC<sub>50</sub> Lucentis: 7,137 нМ; EC<sub>50</sub> #802: 0,8221 нМ. Фиг.8b: Сравнение Lucentis и 578max (#821) в конкурентном ELISA VEGFR2. Фиг.8с: Сравнение Lucentis, 511maxC-his и 534max в HUVEC-анализе. R<sup>2</sup> Lucentis 0,9399; R<sup>2</sup> EP511maxC-his: 0,9313, R<sup>2</sup> EP534max: 0,7391. EC<sub>50</sub> Lucentis: 0,08825 нМ, EC<sub>50</sub> 511maxC-his: 0,7646 нМ, EC<sub>50</sub> 534max: 63,49 нМ. Фиг.8d: 45 Сравнение Lucentis, 578min и 578max в HUVEC-анализе. R<sup>2</sup> Lucentis: 0,9419, R<sup>2</sup> EP578min: 0,8886, R<sup>2</sup> EP578max: 0,9274. EC<sub>50</sub> Lucentis: 0,1529 нМ, EC<sub>50</sub> 578min: 1,528 нМ, EC<sub>50</sub> 578max: 0,1031 нМ.

Фиг.9 иллюстрирует действия 578minmax на пролиферацию HUVEC, индуцируемую

hVEGF165. Параметры этого анализа были следующими: 0,08 нМ (3 нг/мл); инкубирование с VEGF и тест-изделием: 96 часов. EC50 была равна 0,08959 нМ для Lucentis и 0,05516 нМ для 578minmax, в то время как  $R^2$  был равен 0,9066 для Lucentis и 0,9622 для 578minmax.

5 Фиг.10 иллюстрирует действия 578minmax на пролиферации HUVEC, индуцируемые VEGF164 мыши и VEGF164 крысы. Параметры этого анализа были следующими: концентрация VEGF164 мыши: 0,08 нМ (3 нг/мл); концентрация VEGF164 крысы: 0,3 нМ (11,3 нг/мл). Обе концентрации выбирали при EC90 для VEGF-индуцированной пролиферации HUVEC; инкубирование с VEGF и тест-изделием: 96 часов. Фиг.10а  
10 иллюстрирует данные, полученные для VEGF мыши. EC50 была равна 0,1196 нМ для V1253 и 0,06309 нМ для 578minmax, в то время как  $R^2$  был равен 0,02744 для Lucentis, 0,9348 для V1253 и 0,9767 для EP578minmax. Lucentis не ингибировал пролиферацию HUVEC, индуцированную VEGF мыши. Фиг.10b иллюстрирует данные, полученные  
15 для VEGF крысы. EC50 была равна 1,597 нМ для V1253 и 0,06974 нМ для 578minmax, в то время как  $R^2$  был равен 0,7664 для V1253 и 0,6635 для 578minmax.

Фиг.11 иллюстрирует исследования эффективности с использованием анализа Miles в голых морских свинках (часть I). Голым морским свинкам вводили внутривенно краситель альмаровый синий. Спустя один час после инъекции красителя премикс 2  
20 hVEGF (2,61 нМ) и Lucentis, ESBA903 или #802, соответственно, инъецировали в кожу животного 3. Спустя один час после инъекции этих растворов животных 3 эвтаназировали и шкурки собирали, очищали и фотографировали цифровым способом с использованием падающего света и рассеянного света. Площадь красителя Evans Blue, который просачивался в места инъекции, оценивали с использованием изображения  
25 J и строили график зависимости площади удерживания от дозы.

Фиг.12 иллюстрирует исследования эффективности с использованием анализа Miles в голых морских свинках (часть II). Фиг.12а показывает результаты, полученные для #803 (511max). EC50 была равна 5,990 нМ и имела статистический разброс между 2,060  
30 и 17,41 нМ, тогда как  $R^2$  был равен 0,5800. Фиг.12b показывает результаты, полученные для ESBA903 (578minmax). EC50 был равен 3,989 и имел статистический разброс между 1,456 и 10,93 нМ, тогда как  $R^2$  был равен 0,3920. Фиг.12с показывает зону просачивания красителя для Lucentis. EC50 для Lucentis не могла быть рассчитана вследствие плохой подгонки кривой.

35 Фиг.13 иллюстрирует исследования эффективности с использованием модифицированного анализа Miles в крысах (предварительно смешанные hVEGF165 и 578minmax (ESBA903)). Фиг.13а иллюстрирует понижающую проницаемость эффективность Авастина на VEGF-индуцированном ретинальном васкулярном просачивании в крысах - доза-ответ. Авастин ингибирует hVEGF-индуцируемую  
40 ретинальную васкулярную проницаемость. Предварительное смешивание перед инъекцией. Приблизительно эквимоллярные, 3-кратный или 10-кратный избыток. \* $p < 0,05$  (VEGF vs. BSA), \*\* $p < 0,05$  (Авастин-обработанные vs. VEGF). Фиг.13b показывает понижающую проницаемость эффективность ESBA903 после VEGF-индуцируемого ретинального васкулярного просачивания в крысах. Доза-ответ (предварительно смешанные, ivt). Полное ингибирование hVEGF-индуцируемой ретинальной васкулярной  
45 проницаемости ESBA903. Предварительное смешивание перед инъекцией. Приблизительно эквимоллярные, 3-кратный или 10-кратный избыток. \* $p < 0,05$  (VEGF s. BSA), \*\* $p < 0,05$  (ESBA903-обработанные vs. VEGF).

Фиг.14 иллюстрирует исследования эффективности с использованием

модифицированного анализа Miles в крысах (местное введение 578minmax (ESBA903)).  
 Понижающую проницаемость AL-51287 (ESBA903) после VEGF-индуцированного  
 ретинального васкулярного просачивания в крысах испытывали после местного  
 введения. За пять дней перед обработкой, 4 капли/день с 10 нг/мл готовой формы  
 5 ESBA903. \* $p < 0,05$  (VEGF vs. BSA), \*\* $p < 0,05$  (VEGF vs. AL-51287), \*\*\* $p = 0,060$  (AL-51287  
 vs. AL-52667), \*\*\*\*(VEGF vs. AL-39324);  $p < 0,05$  (AL-39324 vs. носителя-ссылочного  
 контроля). AL-51287: ESBA903; AL-52657: местный носитель-ссылочный контроль; AL-  
 39324: ингибитор-малая молекула RTK.

Фиг.15 иллюстрирует определение CDR1 VH, используемое в настоящем описании.

#### 10 **Подробное описание**

Изобретение относится к растворимым и стабильным анти-VEGF-связывающим  
 агентам, содержащим CDR из моноклональных антител кролика. Указанные  
 иммуносвязывающие агенты предназначены для диагностики и/или лечения VEGF-  
 опосредованных нарушений. Также описаны гибридомы, нуклеиновые кислоты, векторы  
 15 и клетки-хозяева для экспрессии рекомбинантных антител по настоящему изобретению,  
 способы их выделения и использование указанных антител в медицине.

#### **Определения**

Для облегчения понимания настоящего изобретения некоторые термины будут  
 определены следующим образом. Дополнительные определения представлены во всем  
 20 подробном описании.

Термин "VEGF" относится к состоящему из 165 аминокислот эндотелиальному  
 фактору роста сосудов и соответствующим состоящим из 121 аминокислоты, 189  
 аминокислот и 206 аминокислот эндотелиальным факторам роста сосудов, описанным  
 Leung et al., Science 246:1306 (1989) и Houck et al., Mol. Endocrin. 5:1806 (1991), а также к  
 25 природным аллельным и процессированным формам этих факторов роста.

Термин "VEGF-рецептор" или "VEGFr" относится к клеточному рецептору VEGF,  
 обычно рецептору клеточной поверхности, обнаруживаемому на эндотелиальных  
 клетках сосудов, а также его вариантам, которые сохраняют способность связываться  
 с hVEGF. Одним из примеров VEGF-рецептора является fms-подобная тирозинкиназа  
 (flt), трансмембранный рецептор в семействе тирозинкиназ. DeVries et al., Science 255:  
 30 989 (1992); Shibuya et al., Oncogene 5:519 (1990). Рецептор flt содержит внеклеточный  
 домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен с тирозинкиназной  
 активностью. Внеклеточный домен участвует в связывании с VEGF, тогда как  
 внутриклеточный домен участвует в трансдукции сигнала. Другим примером VEGF-  
 35 рецептора является рецептор flk-1 (также называемый KDR). Matthews et al., Proc. Nat.  
 Acad. Sci. 88:9026 (1991); Terman et al., Oncogene 6:1677 (1991); Terman et al., Biochem.  
 Biophys. Res. Commun. 187:1579 (1992). Связывание VEGF с рецептором flt приводит к  
 образованию по меньшей мере двух высокомолекулярных комплексов со средней  
 молекулярной массой 205000 и 300000 Дальтон. Считается, что комплекс 300000 Дальтон  
 40 является димером, содержащим две молекулы рецептора, связанные с единственной  
 молекулой VEGF.

Термин "кролик" относится в контексте настоящей заявки к животному,  
 принадлежащему семейству заячьих.

Термин "антитело" является в контексте настоящей заявки синонимом для  
 45 "иммуноглобулина". Антитела по настоящему изобретению могут быть  
 полноразмерными иммуноглобулинами или их фрагментами, содержащими по меньшей  
 мере один переменный домен иммуноглобулина, такими как отдельные переменные  
 домены, Fv (Skerra A. and Pluckthun, A. (1988) Science 240:1038-41), scFv (Bird, R.E. et al.

(1988) Science 242:423-26; Huston, J.S. et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83), Fab, F(ab')<sub>2</sub> или другие фрагменты, хорошо известные специалисту в данной области.

Термин "CDR" относится к одному из шести гипервариабельных районов в вариабельных доменах антитела, которые в основном способствуют связыванию антитела с антигеном. Одно из наиболее часто используемых определений для этих шести CDR представлено в статье Kabat E.A. et al. (1991) Sequences of proteins of immunological interest. NIH Publication 91-3242). В контексте настоящей заявки, определение CDR Кабата относится только к CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного домена легкой цепи (CDR L1, CDR L2, CDR L3 или L1, L2, L3), а также к CDR2 и CDR3 вариабельного домена тяжелой цепи (CDR H2, CDR H3 или H2, H3). Однако CDR1 тяжелой цепи (CDR H1 или H1) определяется в данном случае следующими остатками (согласно нумерации Кабата): он начинается с положения 26 и заканчивается перед положением 36. Он является в основном слиянием CDR H1, по-разному определяемым Кабатом и Хотиа (см. также фиг.15 для иллюстрации).

Термин "каркас антитела", или иногда только "каркас", относится в данном случае к части вариабельного домена, либо VL, либо VH, которая служит в качестве каркаса для антигенсвязывающих петель (CDR) вариабельного домена. В сущности, он является вариабельным доменом без CDR.

Термин "одноцепочечное антитело", "одноцепочечный Fv" или "scFv" относится к молекуле, содержащей вариабельный домен тяжелой цепи антитела (или район; V<sub>H</sub>) и вариабельный домен легкой цепи (или район; V<sub>L</sub>), связанные линкером. Такие молекулы scFv могут иметь общие структуры: NH<sub>2</sub>-V<sub>L</sub>-линкер-V<sub>H</sub>-COOH или NH<sub>2</sub>-V<sub>H</sub>-линкер-V<sub>L</sub>-COOH.

В контексте настоящей заявки, "идентичность" обозначает совпадение последовательности двух полипептидов, молекул или двух нуклеиновых кислот. Если какое-либо положение в обеих из этих двух сравниваемых последовательностей занято одним и тем же основанием или мономерной аминокислотной субъединицей (например, если какое-либо положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином или какое-либо положение в каждом из двух полипептидов занято лизином), то соответствующие молекулы являются идентичными в этом положении. "Процентная идентичность" двух последовательностей является функцией числа совпадающих положений, являющихся общими для этих двух последовательностей, деленного на число сравниваемых положений x 100. Например, если совпадают 6 из 10 положений в двух последовательностях, то эти последовательности имеют 60% идентичность. В качестве примера, DNA-последовательности CTGACT и CAGGTT имеют 50% идентичность (совпадают 3 из 6 общих положений). Обычно сравнение делается при сопоставлении двух последовательностей для получения максимальной идентичности. Такое сопоставление может быть обеспечено с использованием, например, способа Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453, осуществляемого предпочтительно компьютерными программами, такими как программа Align (DNASTar, Inc.). Процентная идентичность двух аминокислотных последовательностей может быть также определена с использованием алгоритма E. Meyers and W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:1 1-17 (1988)), который включен в программу ALIGN (версию 2.0), с использованием таблицы PAM120 взвешенных остатков, штрафа за удлинение 12 и штрафа за пропуск 4. Кроме того, процентная идентичность между двумя аминокислотными последовательностями может быть определена с использованием алгоритма Needleman и Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в пакете программ GCG.software

(доступном в [www.gcg.com](http://www.gcg.com)), с использованием либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250 и величины пропуска 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и величины удлинения 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

"Сходными" последовательностями являются последовательности, которые при сравнении имеют идентичные и сходные аминокислотные остатки, где сходные остатки являются консервативными заменами соответствующих аминокислотных остатков при выравнивании ссылочной последовательности. В этом отношении, "консервативная замена" остатка в эталонной последовательности является заменой остатком, который является физически или функционально сходным с соответствующим ссылочным остатком, например, который имеет сходные размер, форму, электрический заряд, химические свойства, в том числе способность образовывать ковалентные или водородные связи, или т.п. Таким образом, "модифицированная консервативной заменой" последовательность является последовательностью, которая отличается от эталонной последовательности или последовательности дикого типа тем, что присутствуют одна или несколько консервативных замен. "Процентное сходство" двух последовательностей является функцией числа положений, которые содержат совпадающие остатки или консервативные замены, общие у этих двух последовательностей, разделенного на число сравниваемых положений,  $\times 100$ . Например, если 6 из 10 положений в двух последовательностях совпадают и 2 из 10 положений содержат консервативные замены, то эти две последовательности имеют 80% положительное сходство.

В контексте настоящей заявки, термин "модификации консервативными последовательностями" обозначает аминокислотные модификации, которые не оказывают отрицательного влияния на свойства связывания или не изменяют свойства связывания антитела, содержащего эту аминокислотную последовательность. Такие модификации с консервативными заменами включают нуклеотидные и аминокислотные замены, добавления и делеции. Например, модификации могут быть введены стандартными способами, известными в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены включают в себя замены, в которых аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, были определены в данной области. Эти семейства включают в себя аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, прогнозируемый не являющийся незаменимым аминокислотный остаток в антителе против VEGF человека, предпочтительно заменяют другим аминокислотным остатком того же самого семейства боковых цепей. Способы идентификации нуклеотидных и аминокислотных консервативных замен, которые не влияют на связывание с антигеном, хорошо известны в данной области (см., например, Brummell et al., *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999) и Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

"Аминокислотной консенсусной последовательностью" называют в контексте

настоящей заявки аминокислотную последовательность, которая может быть получена с использованием матрицы из по меньшей мере двух, и предпочтительно, более, выравненных аминокислотных последовательностей и допускает пропуски в этом сопоставлении, так чтобы можно было определить наиболее частый аминокислотный остаток в каждом положении. Консенсусной последовательностью является последовательность, которая содержит аминокислоты, которые наиболее часто присутствуют в каждом положении. В случае, когда две или более аминокислоты представлены одинаково в одном положении, эта консенсусная последовательность включает в себя обе или все эти аминокислоты.

Аминокислотную последовательность белка можно анализировать на различных уровнях. Например, консервативность или варибельность может проявляться на уровне единственного остатка, на уровне множественных остатков, множественных остатков с пропусками и тому подобное. Остатки могут проявлять консервативность идентичного остатка или могут быть консервативными на уровне класса. Примеры классов аминокислот включают полярные, но не заряженные R-группы (серин, треонин, аспарагин и глутамин); положительно заряженные R-группы (лизин, аргинин и гистидин); отрицательно заряженные R-группы (глутаминовая кислота и аспарагиновая кислота); гидрофобные R-группы (аланин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, триптофан, валин и тирозин) и особые аминокислоты (цистеин, глицин и пролин). Специалисту в данной области известны другие классы, и они могут быть определены с использованием структурных определений или других данных для оценки заменяемости. В этом смысле, заменяемой аминокислотой может быть названа любая аминокислота, которая может быть заменена и может сохранять функциональную консервативность в этом положении.

Однако следует учитывать, что аминокислоты в одном и том же классе могут различаться по своим биофизическим свойствам. Например, понятно, что некоторые гидрофобные R-группы (например, аланин, серин или треонин) являются более гидрофильными (т.е. имеют более высокую гидрофильность или более низкую гидрофобность), чем другие гидрофобные R-группы (например, валин или лейцин). Относительная гидрофильность или гидрофобность может быть определена общепринятыми в данной области способами (см., например, Rose et al., Science, 229: 834-838 (1985) и Cornette et al., J. Mol Biol, 195: 659-685 (1987)).

В контексте настоящей заявки, при сравнении одной аминокислотной последовательности (например, первой последовательности  $V_H$  или  $V_L$ ) с одной или несколькими дополнительными аминокислотными последовательностями (например, одной или несколькими  $V_H$  или  $V_L$  в базе данных), положение аминокислоты в одной последовательности (например, первой последовательности  $V_H$  или  $V_L$ ) может сравниваться с "соответствующим положением" в одной или нескольких дополнительных аминокислотных последовательностях. В контексте настоящей заявки, "соответствующее положение" представляет эквивалентное положение в последовательности(ях), сравниваемых при оптимальном сопоставлении этих последовательностей, т.е. при сравнении этих последовательностей с достижением максимальной процентной идентичности или высочайшего процентного сходства.

В контексте настоящей заявки, термин "база данных антител" относится к коллекции двух или более аминокислотных последовательностей антител ("множеству" последовательностей) и обычно относится к коллекции десятков, сотен или даже тысяч аминокислотных последовательностей. База данных последовательностей может хранить аминокислотные последовательности, например, коллекции  $V_H$ -районов

антител,  $V_L$ -районов антител или обоим или может хранить коллекцию scFv-последовательностей, содержащих  $V_H$ - и  $V_L$ -районы. Предпочтительно, эта база данных хранит в доступной для поиска, фиксированной среде, например, в компьютере в доступной для поиска компьютерной программе. В одном из вариантов осуществления, база данных антител является базой данных, содержащей последовательности антител эмбрионального типа или состоящей из последовательностей антител эмбрионального типа. В другом варианте осуществления, база данных антител является базой данных, содержащей зрелые (т.е. экспрессируемые) последовательности антител или состоящей из зрелых (т.е. экспрессируемых) последовательностей антител (например, базой данных Кабата зрелых последовательностей антител, например, базой данных KBD). Еще в одном из вариантов осуществления, эта база данных содержит функционально выбранные последовательности или состоит из функционально выбранных последовательностей (например, последовательностей, выбранных на основе QC-анализа).

Термин "иммуносвязывающий агент" относится к молекуле, которая содержит весь антигенсвязывающий сайт или часть антигенсвязывающего сайта антитела, например, весь переменный домен тяжелой цепи и/или легкой цепи или часть переменного домена тяжелой цепи и/или легкой цепи, так что этот иммуносвязывающий агент связывает антиген-мишень. Не ограничивающие примеры иммуносвязывающих агентов включают полноразмерные молекулы иммуноглобулинов и одноцепочечные scFv, а также фрагменты антител, включающие, но не ограничивающиеся ими, (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  и  $C_H1$ ; (ii)  $F(ab')_2$ -фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fab'-фрагмент, который по существу является Fab с частью шарнирного района (см. *Fundamental Immunology* (Paul ed., 3.sup.rd ed. 1993); (iv) Fd-фрагмент, состоящий из доменов  $V_H$  и  $C_H1$ ; (v) Fv-фрагмент, состоящий из доменов  $V_L$  и  $V_H$  единственного плеча антитела, (vi) однодоменное антитело, такое как Dab-фрагмент (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546), который состоит из домена  $V_H$  или  $V_L$ , верблюда (см. Hamers-Casterman, et al., *Nature* 363:446-448 (1993) и Dumoulin, et al., *Protein Science* 11:500-515 (2002)) или антитело акулы (например, нанотела Ig-NAR акулы, Nanobodies®); и (vii) нанотело, район тяжелой цепи, содержащий переменный домен и два константных домена.

В контексте настоящей заявки, термин "функциональное свойство" является свойством полипептида (например, иммуносвязывающего агента), в отношении которого является желательным и/или выгодным для специалиста в данной области улучшение (например, относительно общепринятого полипептида), например, для улучшения свойств приготовления или терапевтической эффективности этого полипептида. В одном из вариантов осуществления, этим функциональным свойством является стабильность (например, термостабильность). В другом варианте осуществления, этим функциональным свойством является растворимость (например, при клеточных условиях). Еще в одном из вариантов осуществления, этим функциональным свойством является отсутствие агрегации. Еще в одном из вариантов осуществления, этим функциональным свойством является экспрессия белка (например, в прокариотической клетке). Еще в одном из вариантов осуществления, этим функциональным свойством является эффективность рефолдинга после солиubilизации тельца включения в соответствующем процессе очистки. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающая активность не является функциональным свойством, которое

желательно улучшить.

Термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта" относится к сайту на антигене (например, на VEGF), с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14  
5 или 15 последовательных или непоследовательных аминокислот в уникальной пространственной конформации. См., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Термины "специфическое связывание", "селективное связывание", "селективно связывается" и "специфически связывается" относятся к связыванию антитела с эпитопом  
10 на предварительно определенном антигене. Обычно, это антитело связывается с аффинностью ( $K_D$ ), приблизительно меньшей чем  $10^{-7}$  М, например, меньшей чем приблизительно  $10^{-8}$  М,  $10^{-9}$  М или  $10^{-10}$  М или даже более низкой.

Термин " $K_D$ " или " $K_d$ " относится к константе диссоциации в равновесном состоянии  
15 конкретного взаимодействия антитело-антиген. Обычно антитела по настоящему изобретению связываются с VEGF с константой диссоциации равновесного состояния ( $K_D$ ), меньшей чем приблизительно  $10^{-7}$  М, например, меньшей чем приблизительно  $10^{-8}$  М,  $10^{-9}$  М или  $10^{-10}$  М, или даже более низкой, например, определенной технологией  
20 резонанса поверхностных плазмонов (SPR) в приборе BIACORE.

Термины "нейтрализует VEGF", "ингибирует VEGF" и "блокирует VEGF" используются взаимозаменяемо для обозначения способности антитела по настоящему изобретению  
препятствовать взаимодействию антитела по настоящему изобретению с одним или несколькими VEGF-рецепторами, такими как VEGFR-1 и/или VEGFR-2, и, например,  
25 запуску трансдукции сигнала.

"Рекомбинантный иммуносвязывающий агент" относится в контексте настоящей заявки к иммуносвязывающему агенту, продуцируемому экспрессией из рекомбинантной ДНК.

"Химерный" иммуносвязывающий агент в контексте настоящей заявки имеет часть  
30 тяжелой цепи и/или легкой цепи, идентичную соответствующей последовательности или гомологичную соответствующим последовательностям антитела, полученных из конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи (цепей) является идентичной с соответствующими  
35 последовательностями или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител. Используемое в данном случае гуманизированное антитело является субпопуляцией химерных антител.

"Гуманизированные антитела" обозначают в контексте настоящей заявки иммуносвязывающие агенты, которые были синтезированы с использованием  
40 технологии рекомбинантных ДНК для исключения иммунной реакции на чужеродные антигены. Гуманизация является хорошо известным способом уменьшения иммуногенности моноклональных антител, полученных из ксеногенных источников. Она включает выбор акцепторного каркаса, предпочтительно, акцепторного каркаса человека, степени CDR из донорского иммуносвязывающего агента, подлежащей  
45 встраиванию в этот акцепторный каркас и замены остатков из донорского каркаса в акцепторный каркас. Общий способ трансплантации CDR в акцепторные каркасы человека был описан Winter в патенте США 5225539, содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В US 6407213, содержание

которого включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме, раскрыт ряд аминокислотных положений этого каркаса, где замена из донорского иммуносвязывающего агента является предпочтительной.

5 Термин "молекулы нуклеиновой кислоты" относится к молекулам ДНК и молекулам РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но, предпочтительно, она является двухцепочечной ДНК. Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", если она находится в функциональной взаимосвязи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на  
10 транскрипцию этой последовательности.

Термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Одним типом вектора является "плазмида", которая является кольцевой двухцепочечной ДНК-петлей, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом  
15 вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих)  
20 могут быть введены в геном клетки-хозяина и посредством этого реплицируются вместе с геномом хозяина.

Термин "клетка-хозяин" относится к клетке, в которую был введен экспрессирующий вектор. Клетки-хозяева могут включать в себя бактериальные, микробные клетки, клетки растений или клетки животных. Бактерии, которые восприимчивы к  
25 трансформации, включают в себя члены семейства Enterobacteriaceae, такие как штаммы Escherichia coli или Salmonella; Bacillaceae, такие как Bacillus subtilis; Pneumococcus; Streptococcus и Haemophilus influenzae. Подходящие микроорганизмы включают в себя Saccharomyces cerevisiae и Pichia pastoris. Подходящие линии клеток-хозяев животных включают в себя СНО (линии яичника китайского хомячка) и клетки NS0.

30 Термины "лечить", "лечение" или "терапия" относятся к терапевтическим или профилактическим мерам, описанным в настоящем описании. Способы "терапии" предусматривают введение больному антитела по настоящему изобретению, например, больному с VEGF-опосредованным нарушением, или больному, который в конечном счете может приобрести такое нарушение, для профилактики, лечения, задержки,  
35 уменьшения тяжести или ослабления одного или нескольких симптомов этого нарушения или рецидива нарушения или для продления выживания индивида за пределы выживания, которые ожидалось в отсутствие такого лечения.

Термин "VEGF-опосредованное нарушение" относится к любому нарушению, возникновению, прогрессированию или хроническим симптомам или состояниям  
40 заболевания, которое требует участия VEGF. Примеры VEGF-опосредованных нарушений включают, но не ограничиваются ими, возрастную дегенерацию желтого пятна, неоваскулярную глаукому, диабетическую ретинопатию, ретинопатию недоношенных, ретролентальную фиброплазию, карциномы молочной железы, карциномы легких, желудочные карциномы, эзофагеальные карциномы, колоректальные  
45 карциномы, карциномы печени, карциномы яичника, комы, арренобластомы, карциномы шейки матки, эндометриальную карциному, эндометриальную гиперплазию, эндометриоз, фибросаркомы, хориокарциному, рак головы и шеи, назофарингеальную карциному, карциномы гортани, гепатобластому, саркому Капоши, меланому, кожные

карциномы, гемангиомы, кавернозную гемангиому, гемангиобластому, карциномы поджелудочной железы, ретинобластому, астроцитому, глиобластому, Шванному, олигодендроглиому, медуллобластому, нейробластомы, рабдомиосаркому, остеогенную саркому, лейомиосаркомы, карциномы мочеполовых путей, карциномы щитовидной железы, опухоль Вильмса, почечно-клеточную карциному, рак предстательной железы, аномальную пролиферацию сосудов, ассоциированную с факоматозом, эдему (например, ассоциированную с опухолями головного мозга), синдром Мейжа, ревматоидный артрит, псориаз и атеросклероз.

Термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" относится к количеству, достаточному для достижения или по меньшей мере для частичного достижения желаемого эффекта. Термин "терапевтически эффективная доза" определяется как количество, достаточное для излечения или по меньшей мере задержки этого заболевания и его осложнений в пациенте, уже страдающем от этого заболевания. Количества, эффективные для этого применения, будут зависеть от тяжести подлежащего лечению нарушения и общего состояния собственной иммунной системы пациента.

Термин "индивид" относится к любому человеку или животному (не человеку). Например, способы и композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения индивида с VEGF-опосредованным нарушением.

Термин "Min-трансплантат" или "min" относится в контексте настоящей заявки к гуманизованному варибельному домену, который был получен трансплантацией кроличьих CDR из кроличьего варибельного домена в природный акцепторный каркас человека (FW 1.4, SEQ ID NO: 172). В этих каркасных районах не проводят никаких изменений. Сам каркас предварительно выбран с точки зрения желаемых функциональных свойств (растворимости и стабильности).

Термин "Max-трансплантат" или "max" относится в контексте настоящей заявки к гуманизованному варибельному домену, который был получен трансплантацией кроличьих CDRs из кроличьего варибельного домена в "модифицированный консервативными кроличьими остатками" акцепторный каркас человека "RabTor" (rFW1.4, SEQ ID NO: 173), или в его производное, называемое rFW1.4(v2) (SEQ ID NO: 174). Этот каркас "RabTor" получали включением консервативных кроличьих остатков (или же остатков, которые являются довольно варибельными в других видах) в положения каркаса, обычно участвующих в структуре и стабильности варибельного домена кролика, с целью генерирования универсально применимого каркаса, который принимает фактически любой набор кроличьих CDR без необходимости трансплантации остатков донорского каркаса, других, чем остатки в положениях, которые являются различными в их предполагаемой последовательности-предшественнике, например, которые были изменены во время соматической гипермутации и, следовательно, возможно, влияют на связывание антигена. Определено, что эта предполагаемая последовательность-предшественник является самой близкой копией зародышевой линии кролика, и в случае, когда эта самая близкая копия зародышевой линии не может быть установлена, консенсусом кроличьей подгруппы или консенсусом последовательностей кролика с высоким процентным сходством.

Термин "Min-Max" или "minmax" относится в контексте настоящей заявки к гуманизованному варибельному домену, содержащему варибельную легкую цепь, соединенную с варибельной тяжелой цепью "Max-graft".

Термин "Max-Min" или "maxmin" относится в контексте настоящей заявки к гуманизованному варибельному домену, содержащему варибельную легкую цепь "Max-graft", соединенную с варибельной тяжелой цепью "Min-graft".

Для этих полученных иммуносвязывающих агентов использовали различные номенклатуры. Они обычно идентифицируются по номеру (например, №578). В случаях, когда использовался префикс, такой как EP или Epi (например, EP №578, который идентичен Epi 578), посредством этого указывался тот же самый иммуносвязывающий агент. Иногда иммуносвязывающий агент получал второе обозначение, которое идентифицируется префиксом "ESBA". Например, ESBA903 обозначает тот же самый иммуносвязывающий агент, что и 578minmax или EP578minmax или Epi578minmax.

Если нет другого определения, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют значение, обычно понимаемое специалистом в данной области, к которой относится это изобретение. Хотя в практике или испытании настоящего изобретения могут использоваться способы и материалы, сходные с описанными или эквивалентные описанным в настоящем описании, ниже описаны подходящие способы и материалы. В случае противоречия, эталоном будет являться настоящее описание, включающее в себя определения. Кроме того, эти материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Различные аспекты по настоящему изобретению описаны более подробно в следующих подразделах. Понятно, что различные варианты, предпочтения и диапазоны могут произвольно комбинироваться. Кроме того, в зависимости от конкретного варианта осуществления, выбранные определения, варианты или диапазоны могут не применяться.

#### **Анти-VEGF-иммуносвязывающие агенты**

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к иммуносвязывающим агентам, которые связывают VEGF и, следовательно, блокируют функцию VEGF in vivo. CDR этих иммуносвязывающих агентов происходят из кроличьих моноклональных антител против VEGF, которые получены у кроликов, иммунизированных VEGF человека и/или его фрагментом (SEQ ID NO: 1). Насколько известно авторам по настоящему изобретению, впервые моноклональные антитела против VEGF получены у кроликов и подробно охарактеризованы. Неожиданно, было обнаружено, что аффинность ( $K_d$ ) была чрезвычайно высокой.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к иммуносвязывающему агенту, который специфически связывается с VEGF, содержащему последовательность по меньшей мере одного из CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 или CDRL3. Примеры аминокислотных последовательностей CDR, которые можно использовать в иммуносвязывающих агентах по настоящему изобретению, представлены в SEQ ID NO: 2-72 (таблицы 1-6).

#### Таблица 1

Аминокислотные последовательности CDR H1 анти-VEGF-иммуносвязывающих агентов по настоящему изобретению

Идентификатор последовательности	CDR-H1	SEQ ID No.
60-11-4	GFPFSSGYWVC	2
60-11-6	GFSFSSGYWIC	3
435	GFSLNTNYWMC	4
453	GFSFSRSYYIY	5
375	GFSFTTTDYMC	6
610	GIDFSGAYYMG	7
578	GFSLTDYYMT	8
534	GFSLSYYMS	9
567	GFSLSDYMC	10
509	GFSLSYYMC	11
511	GFSLNTYYMN	12
509maxII	GFSLSYYMS	13
Консенсус	GFSLSSGYMC	14

Таблица 2

Аминокислотные последовательности CDR H2 анти-VEGF-иммуносвязывающих агентов по настоящему изобретению

Идентификатор последовательности	CDR-H2	SEQ ID No.
60	CIYAGSSGSTYYASWAKG	15
435	CMYTGSYNRAYASWAKG	16
453	CIDAGSSGILVYANWAKG	17
375	CILAGDGSTYYANWAKG	18
610	YIDYDGDRYYASWAKG	19
578	FIDPDDDPYYATWAKG	20
534	IIGPGDYTDYASWAKG	21
567	CLDYFGSTDDASWAKG	22

509	CLDYVGD TDYASWAKG	23
511	IIAPDDT TYASWAKS	24
509maxII	ILDYVGD TDYASWAKG	25
Консенсус	CIDAGSD GD TYASWAKG	26

Таблица 3

Аминокислотные последовательности CDR H3 анти-VEGF-иммуносвязывающих агентов по настоящему изобретению

Идентификатор последовательности	CDR-H3	SEQ ID No.
60	GNNYIYTDGGYAYAGLEL	27
435	GSNWYSDL	28
453	GDASYGVDSFMLPL	29
375	SDPASSWSFAL	30
610	SDYSSGWGTDI	31
578	GDHNSGWGLDI	32
534	GDDNSGWGED I	33
567	TDDSRGWGLNI	34
509	TDDSRGWGLNI	35
511	SGDTTAWGADI	36
Консенсус	GDDSSGYTDGGYAYWGLDI	37

Таблица 4

Аминокислотные последовательности CDR L1 анти-VEGF-иммуносвязывающих агентов по настоящему изобретению

Идентификатор последовательности	CDR-L1	SEQ ID No.
60	QASQSISSYLS	38
435	QASQSIGSSLA	39
453	QSSQSVWNNRLA	40

	375	QASENINIWLS	41
	610	QASQSISSWLS	42
5	578	QASEIIHSWLA	43
	534	QASQSINIWLS	44
	567	QADQSIYIWLS	45
10	509	QASQNIRIWLS	46
	511	QASQSINIWCS	47
	511max	QASQSINIWLS	48
15	Консенсус	QASQSININWLS	49

Таблица 5

Аминокислотные последовательности CDR L2 анти-VEGF-иммуносвязывающих агентов по настоящему изобретению

20	Идентификатор последовательности	CDR-L2	SEQ ID No.
	60	KASTLAS	50
	435	TAANLAS	51
25	453	YASTLAS	52
	375	QASKLAS	53
	610	QASTLAS	54
30	578	LASTLAS	55
	534	KESTLAS	56
	567	KASTLES	57
35	509	KASTLES	58
	511	RASTLAS	59
	Консенсус	KASTLAS	60

Таблица 6

Аминокислотные последовательности CDR L3 анти-VEGF-иммуносвязывающих агентов по настоящему изобретению

45

Идентификатор последовательности	CDR-L3	SEQ ID No.
60	QSNYGGSSSDYGNP	61
435	QNFATSDTVT	62
453	AGGYSSTSDNT	63
375	QNNYSYNYRYP	64
610	QNNYGFRSYGGA	65
578	QNVYLASTNGAN	66
534	QNNYDSGNNGFP	67
567	QNNAHYSTNGGT	68
509	QNNAHYSTNGGT	69
511	QANYAYSAGYGAA	70
Консенсус	QNNYHYSSSTNGGT	71

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к иммуносвязывающему агенту, содержащему по меньшей мере один CDR, имеющий по меньшей мере 75% сходство, предпочтительно, по меньшей мере 75% идентичность, более предпочтительно, по меньшей мере 80%, 85%, 90% 95%, еще более предпочтительно, 100% идентичность с консенсусной последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 71. Предпочтительно, VH указанного иммуносвязывающего агента содержат CDR из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 37, и/или CDR VL указанного иммуносвязывающего агента содержит CDR из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 71. Предпочтительно, CDR выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 - SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 - SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50 - SEQ ID NO: 59 и SEQ ID NO: 61 - SEQ ID NO: 70.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к иммуносвязывающему агенту, содержащему по меньшей мере один CDR, имеющему по меньшей мере 75% сходство, предпочтительно, по меньшей мере 75% идентичность, более предпочтительно, по меньшей мере 80%, 85%, 90% 95%, еще более предпочтительно, 100% идентичность с консенсусной последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 61. Предпочтительно, VH указанного иммуносвязывающего агента содержат CDR из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 27 и/или CDR VL указанного иммуносвязывающего агента содержат CDR из группы, состоящей из SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 61. В другом предпочтительном варианте осуществления, VH указанного иммуносвязывающего агента содержат CDR из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 27, и/или CDR VL указанного иммуносвязывающего агента содержат CDR из группы, состоящей из SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 61.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к



по меньшей мере 80%, 85%, 90% 95%, еще более предпочтительно, 100% идентичность с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 67. Предпочтительно, VH указанного иммуносвязывающего агента содержат CDR из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 33, и/или CDR VL иммуносвязывающего агента содержат CDR из группы, состоящей из SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 67.

В другом варианте осуществления, изобретение относится к иммуносвязывающему агенту, содержащему по меньшей мере один CDR, имеющему по меньшей мере 75% сходство, предпочтительно, по меньшей мере 75% идентичность, более предпочтительно, по меньшей мере 80%, 85%, 90% 95%, еще более предпочтительно, 100% идентичность с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 57 и SEQ ID NO: 68. Предпочтительно, VH указанного иммуносвязывающего агента содержат CDR из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 34, и/или CDR VL указанного иммуносвязывающего агента содержат CDR из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 57 и SEQ ID NO: 68.

В другом варианте осуществления, изобретение относится к иммуносвязывающему агенту, содержащему по меньшей мере один CDR, имеющему по меньшей мере 75% сходство, предпочтительно, по меньшей мере 75% идентичность, более предпочтительно, по меньшей мере 80%, 85%, 90% 95%, еще более предпочтительно, 100% идентичность с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 69.

Предпочтительно, VH указанного иммуносвязывающего агента содержат CDR из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 35, и/или CDR VL указанного иммуносвязывающего агента содержат CDR из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 69. Альтернативно, VH указанного иммуносвязывающего агента содержат CDR из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 35, и/или CDR VL указанного иммуносвязывающего агента содержат CDR из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 69.

В другом варианте осуществления, изобретение относится к иммуносвязывающему агенту, содержащему по меньшей мере один CDR, имеющему по меньшей мере 75% сходство, предпочтительно, по меньшей мере 75% идентичность, более предпочтительно, по меньшей мере 80%, 85%, 90% 95%, еще более предпочтительно, 100% идентичность с последовательностью из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 59, и SEQ ID NO: 70. Предпочтительно, VH указанного иммуносвязывающего агента содержат CDR из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 36. Дополнительно или альтернативно, VL указанного иммуносвязывающего агента содержат CDR из группы, состоящей из SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 59 и SEQ ID NO: 70, например, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 59 и SEQ ID NO: 70; или SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 59 и SEQ ID NO: 70.

В еще более предпочтительном варианте осуществления, описанный в настоящем описании иммуносвязывающий агент нейтрализует VEGF человека и перекрестно реагирует с крысиным/мышинным VEGF или его частью.

Иммуносвязывающий агент может содержать антитело или любой альтернативный связывающий каркас, способный вмещать CDR. CDR, представленные как SEQ ID NO: 2-72, могут быть трансплантированы в любой подходящий связывающий каркас известными в данной области способами (см., например, Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; патент США 5225539 Winter и патенты США 5530101;

5585089; 5693762 и 6180370, Queen et al.). Однако предпочтительно описанные в настоящем описании иммуносвязывающие агенты являются гуманизированными и, следовательно, подходят для терапевтического использования.

В случае антител, кроличьи CDR, представленные как SEQ ID NO: 2-72, могут быть трансплантированы в каркасные районы любого антитела любого вида. Однако ранее было показано, что антитела или производные антител, содержащие каркасы, идентифицированные в так называемом скрининге "контроля качества" (WO 0148017), характеризуются обычно высокой стабильностью и/или растворимостью и, следовательно, могут также использоваться в контексте внеклеточных применений, таких как нейтрализация VEGF человека. Кроме того, дополнительно было обнаружено, что одна конкретная комбинация этих растворимых и стабильных каркасов VL (вариабельной легкой цепи) и VH (вариабельной тяжелой цепи) является особенно подходящей для вмещения кроличьих CDR. Таким образом, в одном из вариантов осуществления, CDR, представленные как SEQ ID NO: 2-72, трансплантируют в каркасы антител человека, полученные скринингом "контроля качества", описанным в EP 1479694. Аминокислотные последовательности примерных каркасов для применения в настоящем изобретении, представлены в SEQ ID NO: 172-174. Неожиданно было обнаружено, что после трансплантации в указанный каркас или его производные, может полностью сохраняться петлевая конформация большого разнообразия кроличьих CDR независимо от последовательности донорского каркаса. Кроме того, указанный каркас или его производные, содержащие различные кроличьи CDR, хорошо экспрессируются и продуцируются в отличие от одиночных цепей дикого типа кролика и все еще сохраняют почти полностью аффинность исходных донорских кроличьих антител.

Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления, CDR и/или CDR-мотивы, описанные в настоящем описании, присутствуют в каркасной последовательности вариабельного района тяжелой цепи, имеющей по меньшей мере 80% идентичность последовательности, еще более предпочтительно, по меньшей мере 85%, 90% 95%, даже более предпочтительно, 100% идентичность последовательности SEQ ID NO: 169. В предпочтительном варианте осуществления, каркасная последовательность вариабельного района тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 170 или SEQ ID NO: 171.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления, CDR и/или CDR-мотивы, описанные в данном случае, присутствуют в каркасной последовательности вариабельного района легкой цепи, которая по меньшей мере на 85% идентична, еще более предпочтительно, по меньшей мере на 90% 95%, еще более предпочтительно, на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 167, более предпочтительно, содержащей SEQ ID NO: 167 или SEQ ID NO: 168.

В кроличьих антителах, CDR могут содержать остатки цистеина, которые связываются дисульфидной связью с остатками цистеина в каркасе антитела. Таким образом, может быть необходимым, при трансплантации кроличьих CDR, содержащих остатки цистеина, в не-кроличий каркас, вводить остатки цистеина в не-кроличий каркас, например, мутагенезом, для облегчения стабилизации кроличьего CDR посредством дисульфидной связи.

В других вариантах осуществления, изобретение относится к иммуносвязывающему агенту, который специфически связывается с VEGF, содержащему по меньшей мере одну из аминокислотных последовательностей VL или VH. Примеры аминокислотных последовательностей VH или VL для применения в иммуносвязывающих агентах по

настоящему изобретению представлены в SEQ ID NO: 72-106 и 107-166, соответственно.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретение относится к иммуносвязывающему агенту, содержащему VH, который по меньшей мере на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, на 100% идентичен последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 130 и SEQ ID NO: 131 (VH 60-11-4, VH 60-11-6, VH 60-11-4min, VH 60-11-6min, VH 60-11-4max и VH 60-11-6max, соответственно);

и/или VL, которая по меньшей мере 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, на 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 82 и SEQ ID NO: 93 (VL 60, VL 60min, VL 60max, соответственно).

В другом предпочтительном варианте осуществления, изобретение относится к иммуносвязывающему агенту, содержащему VH, который по меньшей мере на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, на 100% идентичен последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 120 и SEQ ID NO: 132 (VH 435, VH 435min и VH 435max, соответственно);

и/или VL, которая по меньшей мере на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, на 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 83 и SEQ ID NO: 94 (VL 435, VL 435min и VL 435max, соответственно).

Предпочтительно, указанный иммуносвязывающий агент имеет по меньшей мере 80%, более предпочтительно, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, 100% идентичность SEQ ID NO: 175 (435max).

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к иммуносвязывающему агенту, содержащему VH, который по меньшей мере на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, на 100% идентичен последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 121 и SEQ ID NO: 133 (VH 453, VH 453min и VH 453max, соответственно);

и/или VL, которая по меньшей мере на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, на 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 84 и SEQ ID NO: 95 (VL 453, VL 453min и VL 453max, соответственно).

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к иммуносвязывающему агенту, содержащему VH, который по меньшей мере на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, на 100% идентичен последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 122 и SEQ ID NO: 134 (VH 375, VH 375min и VH 375max, соответственно);

и/или VL, которая по меньшей мере на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, на 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 85 и SEQ ID NO: 96 (VL 375, VL 375min и VL 375max, соответственно).

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к иммуносвязывающему агенту, содержащему VH, который по меньшей мере на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно,

на 100% идентичен последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 123 и 135 (VH 610, VH 610min и VH 610max, соответственно);

и/или VL, которая по меньшей мере на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, на 100% идентична

5 последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 97 (VL 610, VL 610min и VL 610max, соответственно).

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к иммуносвязывающему агенту, содержащему VH, который по меньшей мере на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно,

10 на 100% идентичен последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165 и SEQ ID NO: 166 (VH 578 и ее варианты);

и/или VL, которая по меньшей мере 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, на 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 и SEQ ID NO: 105 (VL 578 и ее варианты).

Предпочтительно, указанный иммуносвязывающий агент имеет по меньшей мере 80%, более предпочтительно, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, 100% идентичность с SEQ ID NO: 178 (578min), SEQ ID NO: 179 (578max) или SEQ ID NO: 180 (578minmax).

25 В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к иммуносвязывающему агенту, содержащему VH, который по меньшей мере на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, на 100% идентичен последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 125 и SEQ ID NO: 137 (VH 534, VH 534min и VH 534max,

30 соответственно);

и/или VL, которая по меньшей мере на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, на 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 88 и SEQ ID NO: 99 (VL 534, VL 534min и VL 534max, соответственно).

35 В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к иммуносвязывающему агенту, содержащему VH, который по меньшей мере на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, на 100% идентичен последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 138 и SEQ ID NO: 143 (VH 567, VH 567min и VH 567max, соответственно);

и/или VL, которая по меньшей мере на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, на 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 89 и SEQ ID NO: 100 (VL 567, VL 567min и VL 567max, соответственно).

45 Предпочтительно, указанный иммуносвязывающий агент имеет по меньшей мере 80%, более предпочтительно, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, 100% идентичность с SEQ ID NO: 177 (567min).

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к

иммуносвязывающему агенту, содержащему VH, который по меньшей мере на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, на 100% идентичен последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 139 и SEQ ID NO: 140 (VH 509, VH 509min, VH 509max и VH 509maxII, соответственно);

и/или VL, которая по меньшей мере на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, на 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 90 и SEQ ID NO: 101 (VL 509, VL 509min и VL 509max, соответственно).

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к иммуносвязывающему агенту, содержащему VH, который по меньшей мере на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, на 100% идентичен последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 141 и SEQ ID NO: 145 (VH 511, VH 511min, VH 511max и VH 511maxDHP, соответственно);

и/или VL, которая по меньшей мере на 80%, более предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, на 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 102 и SEQ ID NO: 106 (VL 511, VL 511min, VL 511max и VL 511minC41L, соответственно).

Предпочтительно, указанный иммуносвязывающий агент имеет по меньшей мере 80%, более предпочтительно, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, наиболее предпочтительно, 100% идентичность с SEQ ID NO: 176 (511max).

В некоторых вариантах осуществления, это изобретение дополнительно относится к иммуносвязывающему агенту, который специфически связывается с VEGF, содержащему аминокислотную последовательность с существенным сходством с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2-166 и в SEQ ID NO: 175-180, где этот иммуносвязывающий агент по существу сохраняет или улучшает желаемые функциональные свойства анти-VEGF-иммуносвязывающего агента по настоящему изобретению. Предпочтительные процентные сходства включают в себя, но не ограничиваются ими, по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичность.

В некоторых вариантах осуществления, это изобретение дополнительно относится к иммуносвязывающему агенту, который специфически связывается с VEGF, содержащему аминокислотную последовательность с существенной идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2-166 и в SEQ ID NO: 175-180, где этот иммуносвязывающий агент по существу сохраняет или улучшает желаемые функциональные свойства анти-VEGF-иммуносвязывающего агента по настоящему изобретению. Предпочтительные процентные идентичности включают в себя, но не ограничиваются ими, по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичность.

В некоторых вариантах осуществления, это изобретение дополнительно относится к иммуносвязывающему агенту, который специфически связывается с VEGF, содержащему аминокислотную последовательность с консервативными заменами относительно аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2-166 и в SEQ ID NO: 175-180, где этот иммуносвязывающий агент по существу сохраняет или улучшает желаемые функциональные свойства анти-VEGF-иммуносвязывающего агента по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления, это изобретение относится к иммуносвязывающим агентам, которые связываются специфически с VEGF человека и перекрестно реагируют с молекулами VEGF других видов, например, VEGF мыши, VEGF крысы, VEGF кролика или VEGF морской свинки. В одном конкретном варианте осуществления, анти-VEGF-иммуносвязывающий агент может связываться специфически с VEGF человека и VEGF крысы/мыши.

В некоторых вариантах осуществления, это изобретение относится к иммуносвязывающим агентам, которые связываются специфически с VEGF человека и не реагируют перекрестно с молекулами VEGF других видов, например, VEGF мыши, VEGF крысы, VEGF кролика или VEGF морской свинки.

В некоторых вариантах осуществления, это изобретение относится к иммуносвязывающим агентам, которые связываются специфически с VEGF человека, причем эти иммуносвязывающие агенты являются аффинно зрелыми.

В одном из вариантов осуществления, антитела и фрагменты антител по настоящему изобретению являются одноцепочечными антителами (scFv) или Fab-фрагментами. В случае антител scFv, выбранный VL-домен может быть связан с выбранным VH-доменом в любой ориентации посредством гибкого линкера. Подходящее состояние типичного линкера состоит из повторяемых аминокислотных последовательностей GGGGS или их вариантов. В предпочтительном варианте по настоящему изобретению линкер с аминокислотной последовательностью (GGGGS)<sub>4</sub> представлен в SEQ ID NO: 181, но возможны также варианты из 1-3 повторов (Holliger et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448). Другие линкеры, которые могут быть использованы для по настоящему изобретению, описаны Alfthan et al. (1995), Protein Eng. 8:725-731, Choi et al. (2001), Eur. J. Immunol. 31:94-106, Hu et al. (1996), Cancer Res. 56:3055-3061, Kipriyanov et al. (1999), J. Mol. Biol. 293:41-56 и Roovers et al. (2001), Cancer Immunol. Immunother. 50:51-59. Расположение может быть либо VL-линкер-VH, либо VH-линкер-VL, причем предпочтительной является первая ориентация. Однако обсуждаются также антитела с единственными доменами VH или VL. В случае, Fab-фрагментов, выбранные переменные домены VL легкой цепи сливаются с константным районом каппа-цепи Ig человека, тогда как подходящие переменные домены VH сливаются с первым (N-концевым) константным доменом CH1 IgG человека. На C-конце константного домена или в других сайтах переменного или константного домена может образовываться межцепочечный дисульфидный мостик. Альтернативно, эти две цепи могут быть связаны гибким линкером, что приводит к одноцепочечному Fab-антителу.

Антитела или производные антител по изобретению могут иметь аффинность в отношении VEGF человека с константами диссоциации  $K_d$  в диапазоне  $10^{-14}$ М -  $10^{-5}$ М. В одном из предпочтительных вариантов осуществления по настоящему изобретению  $K_d$  равна  $\leq 1$  нМ. Аффинность антитела в отношении антигена может быть определена экспериментально с использованием подходящего способа (Berzofsky et al. "Antibody-Antigen Interactions", in Fundamental Immunology, Paul, W.E., Ed, Raven Press: New York, NY (1992); Kubly, J. Immunology, W.H. Freeman and Company: New York, NY) и описанных в данном случае способов.

От компании Eritomics доступно антитело против VEGF, которое является кроличьим моноклональным антителом (VEGF (C-term) Rabbit Antibody, Cat.№ 1909-1). Указанное антитело направлено против остатков на C-конце VEGF человека и, следовательно, не способно нейтрализовать VEGF. Таким образом, указанное антитело не пригодно для терапевтических применений. Кроме того, указанный моноклональный IgG не является

гуманизированным антителом, а является природным кроличьим полноразмерным иммуноглобулином. Кроме того, было показано, что это антитело не узнает нативную форму VEGF.

*Иммуносвязывающие агенты, которые связывают одни и те же эпитопы на VEGF*

5 В другом аспекте, это изобретение относится к антителам, которые связываются с эпитопом на VEGF, распознаваемым антителом, содержащим любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO 2-211. Такие антитела могут быть идентифицированы на основании их способности перекрестно взаимодействовать с антителом, содержащим любые одну или несколько из аминокислотных последовательностей, SEQ ID NO: 2-10 211, в стандартном анализе связывания VEGF, включающем, но не ограничивающемся им, ELISA. Способность тестируемого антитела ингибировать связывание с VEGF человека антитела, содержащего любые одну или несколько аминокислотных последовательностей, SEQ ID NO: 2-211, демонстрирует, что это тестируемое антитело может перекрестно конкурировать, следовательно, взаимодействовать с 15 перекрывающимся (совпадающим частично) эпитопом на VEGF человека, в качестве антитела, содержащего одну или несколько из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2-211.

Дополнительно или альтернативно, такие антитела могут быть также идентифицированы стандартными способами картирования эпитопов для определения, 20 связываются ли они с одними и теми же пептидными иммуногенами. Для дополнительного определения точных молекулярных детерминант для взаимодействия антитело/VEGF могут быть также использованы способы структурного моделирования, включающие в себя, но не ограничивающиеся ими, ЯМР, рентгеновскую кристаллографию, моделирование на основе компьютера или томографию белков 25 (Banyay et al., 2004 ASSAY and Drug Development Technologies (2), 5, Page 516-567). Действительно, была установлена кристаллическая структура VEGF и известны поверхностные аминокислотные остатки, участвующие в связывании VEGF<sub>r</sub> (Fuh, et al., 2006, J. Biol. Chem., 281, 6625-6631). Таким образом, при условии, что в данной области доступна аминокислотная последовательность этого пептидного иммуногена 30 и структура VEGF, специалист в данной области вполне может идентифицировать антитела, которые связываются с эпитопом на VEGF, узнаваемым антителами, содержащими любые одну или несколько аминокислотных последовательностей, SEQ ID NO: 2-211.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, которые связываются с эпитопом 35 на VEGF, распознаваемым антителами, содержащими любые одну или несколько аминокислотных последовательностей, SEQ ID NO: 2-211, связываются с VEGF с аффинностью  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , например, по меньшей мере  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^8 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ , по 40 меньшей мере  $10^{12} \text{ M}^{-1}$  или по меньшей мере  $10^{13} \text{ M}^{-1}$ .

В некоторых вариантах осуществления, антитела, которые связываются с эпитопом на VEGF, распознаваемым антителом, содержащим любые одну или несколько аминокислотных последовательностей, SEQ ID NO: 2-211, связываются специфически с VEGF человека и не реагируют перекрестно с молекулами VEGF других видов, 45 например, VEGF мыши, VEGF крысы, VEGF кролика или VEGF морской свинки.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, которые связываются с эпитопом на VEGF, распознаваемым антителом, содержащим любые одну или несколько аминокислотных последовательностей, SEQ ID NO: 2-211, перекрестно реагируют с

молекулами VEGF других видов, например, VEGF мыши, VEGF крысы или VEGF кролика.

**Оптимизированные варианты**

Антитела по настоящему изобретению могут быть дополнительно оптимизированы в отношении увеличенных функциональных свойств, например, в отношении увеличенной растворимости и/или стабильности.

В некоторых вариантах осуществления, антитела по настоящему изобретению оптимизируют в соответствии с методологией "функционального консенсуса", описанной в заявке РСТ с порядковым номером РСТ/EP2008/001958, озаглавленной "Конструирование на основе последовательности и оптимизация одноцепочечных антител", поданной 12 марта 2008 года, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки. Например, иммуносвязывающие агенты VEGF по настоящему изобретению могут сравниваться с базой данных функционально-выбранных scFv для идентификации положений аминокислотных остатков, которые являются либо более, либо менее толерантными в отношении вариабельности, чем соответствующее положение(я), в иммуносвязывающем агенте VEGF, показывая посредством этого, что такое идентифицированное положение(я) остатков может быть пригодно для конструирования для улучшения функциональности, такой как стабильность и/или растворимость.

Примеры положений каркаса для замены описаны в заявке РСТ РСТ/CH2008/000284 "Способы модификации антител и модифицированные антитела с улучшенными функциональными свойствами", поданной 25 июня 2008 года, и заявки РСТ РСТ/CH2008/000284 "Конструирование на основе инженерии и оптимизация одноцепочечных антител", поданной 25 июня 2008 года. Например, одна или несколько из следующих замен могут быть введены в положение аминокислот (Нумерация АНо приводится для каждого положения аминокислоты, в перечне ниже) в вариабельном районе тяжелой цепи иммуносвязывающего агента по настоящему изобретению:

- (a) Q или E в положении аминокислоты 1;
- (b) Q или E в положении аминокислоты 6;
- (c) T, S или A в положении аминокислоты 7, более предпочтительно, T или A, еще более предпочтительно, T;
- (d) A, T, P, V или D, более предпочтительно, T, P, V или D, в положении аминокислоты 10,
- (e) L или V, более предпочтительно, L, в положении аминокислоты 12,
- (f) V, R, Q, M или K, более предпочтительно, V, R, Q или M в положении аминокислоты 13;
- (g) R, M, E, Q или K, более предпочтительно, R, M, E или Q, еще более предпочтительно, R или E, в положении аминокислоты 14;
- (h) L или V, более предпочтительно, L, в положении аминокислоты 19;
- (i) R, T, K или N, более предпочтительно, R, T или N, еще более предпочтительно, N, в положении аминокислоты 20;
- (j) I, F, L или V, более предпочтительно, I, F или L, еще более предпочтительно, I или L, в положении аминокислоты 21;
- (k) R или K, более предпочтительно, K, в положении аминокислоты 45;
- (l) T, P, V, A или R, более предпочтительно, T, P, V или R, еще более предпочтительно, R, в положении аминокислоты 47;
- (m) K, Q, N или E, более предпочтительно, K, N или E, еще более предпочтительно, K, в положении аминокислоты 50;

- (n) M или I, более предпочтительно, I, в положении аминокислоты 55;
- (o) K или R, более предпочтительно, K, в положении аминокислоты 77;
- (p) A, V, L или I, более предпочтительно, A, L или I, еще более предпочтительно, A, в положении аминокислоты 78;
- 5 (q) E, R, T или A, более предпочтительно, E, T или A, еще более предпочтительно, E, в положении аминокислоты 82;
- (r) T, S, I или L, более предпочтительно, T, S или L, еще более предпочтительно, T, в положении аминокислоты 86;
- (s) D, S, N или G, более предпочтительно, D, N или G, еще более предпочтительно, N, в положении аминокислоты 87;
- 10 (t) A, V, L или F, более предпочтительно, A, V или F, еще более предпочтительно, V, в положении аминокислоты 89;
- (u) F, S, H, D или Y, более предпочтительно, F, S, H или D, в положении аминокислоты 90;
- 15 (v) D, Q или E, более предпочтительно, D или Q, еще более предпочтительно, D, в положении аминокислоты 92;
- (w) G, N, T или S, более предпочтительно, G, N или T, еще более предпочтительно, G, в положении аминокислоты 95;
- (x) T, A, P, F или S, более предпочтительно, T, A, P или F, еще более предпочтительно, F, в положении аминокислоты 98;
- 20 (y) R, Q, V, I, M, F или L, более предпочтительно, R, Q, I, M, F или L, еще более предпочтительно, Y, даже более предпочтительно, L, в положении аминокислоты 103;
- и
- (z) N, S или A, более предпочтительно, N или S, еще более предпочтительно, N, в
- 25 положении аминокислоты 107.
- Дополнительно или альтернативно, одна или несколько замен могут быть введены в переменный район легкой цепи иммуносвязывающего агента по настоящему изобретению:
- (aa) Q, D, L, E, S, или I, более предпочтительно, L, E, S или I, еще более
- 30 предпочтительно, L или E, в положении аминокислоты 1;
- (bb) S, A, Y, I, P или T, более предпочтительно, A, Y, I, P или T, еще более предпочтительно, P или T в положении аминокислоты 2;
- (cc) Q, V, T или I, более предпочтительно, V, T или I, еще более предпочтительно, V или T, в положении аминокислоты 3;
- 35 (dd) V, L, I или M, более предпочтительно, V или L, в положении аминокислоты 4;
- (ee) S, E или P, более предпочтительно, S или E, еще более предпочтительно, S, в положении аминокислоты 7;
- (ff) T или I, более предпочтительно, I, в положении аминокислоты 10;
- (gg) A или V, более предпочтительно, A, в положении аминокислоты 11;
- 40 (hh) S или Y, более предпочтительно, Y, в положении аминокислоты 12;
- (ii) T, S или A, более предпочтительно, T или S, еще более предпочтительно, T, в положении аминокислоты 14;
- (jj) S или R, более предпочтительно, S, в положении аминокислоты 18;
- (kk) T или R, более предпочтительно, R, в положении аминокислоты 20;
- 45 (ll) R или Q, более предпочтительно, Q, в положении аминокислоты 24;
- (mm) H или Q, более предпочтительно, H, в положении аминокислоты 46;
- (nn) K, R или I, более предпочтительно, R или I, еще более предпочтительно, R, в положении аминокислоты 47;

(oo) R, Q, K, E, T, или M, более предпочтительно, Q, K, E, T или M, в положении аминокислоты 50;

(pp) K, T, S, N, Q или P, более предпочтительно, T, S, N, Q или P, в положении аминокислоты 53;

5 (qq) I или M, более предпочтительно, M, в положении аминокислоты 56;

(rr) H, S, F или Y, более предпочтительно, H, S или F, в положении аминокислоты 57;

(ss) I, V или T, более предпочтительно, V или T, R, еще более предпочтительно, T, в положении аминокислоты 74;

10 (tt) R, Q или K, более предпочтительно, R или Q, еще более предпочтительно, R, в положении аминокислоты 82;

(uu) L или F, более предпочтительно, F, в положении аминокислоты 91;

(vv) G, D, T или A, более предпочтительно, G, D или T, еще более предпочтительно, T, в положении аминокислоты 92;

(xx) S или N, более предпочтительно, N, в положении аминокислоты 94;

15 (yy) F, Y или S, более предпочтительно, Y или S, еще более предпочтительно, S, в положении аминокислоты 101; и

(zz) D, F, H, E, L, A, T, V, S, G или I, более предпочтительно, H, E, L, A, T, V, S, G или I, еще более предпочтительно, A или V, в положении аминокислоты 103.

20 Система нумерации АНо описана дополнительно в Honegger, A. and Pluckthun, A. (2001) J. Mol. Biol. 309:657-670. Альтернативно, может быть использована система нумерации Кабата, описанная дополнительно в Kabat et al. (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication № 91-3242). Таблицы перевода для этих двух систем нумерации, используемых для идентификации положений аминокислотных остатков в  
25 вариабельных районах тяжелой и легкой цепи обеспечены в A. Honegger, J.Mol.Biol. 309 (2001) 657-670.

В других вариантах осуществления, иммуносвязывающие агенты по настоящему изобретению содержат одну или несколько усиливающих растворимость и/или стабильность мутаций, описанных в предварительной заявке на патент США с  
30 порядковым номером 61/075692 "Оптимизация растворимости иммуносвязывающих агентов", поданной 25 июня 2008 года. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, этот иммуносвязывающий агент содержит увеличивающую растворимость мутацию в положении аминокислоты, выбранном из группы положений аминокислот тяжелой цепи, состоящей из 12, 103 и 144 (АНо Numbering convention). В  
35 одном из предпочтительных вариантов осуществления, этот иммуносвязывающий агент содержит одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из: (а) серина (S) в положении аминокислоты 12 тяжелой цепи; (b) серина (S) или треонина (T) в положении аминокислоты 103 тяжелой цепи и (с) серина (S) или треонина (T) в положении аминокислоты 144 тяжелой цепи. В другом варианте осуществления  
40 иммуносвязывающий агент содержит следующие замены: (а) серин (S) в положении 12 аминокислоты тяжелой цепи; (b) серин (S) или треонин (T) в положении 103 аминокислоты тяжелой цепи и (с) серин (S) или треонин (T) в положении 144 аминокислоты тяжелой цепи

***Гибридомы, экспрессирующие кроличьи антитела против VEGF***

45 В другом аспекте изобретение относится к гибридоме, экспрессирующей моноклональное антитело, содержащее любые одну или несколько аминокислотных последовательностей, представленные SEQ ID NO 72-81 и SEQ ID NO 107-117. Способы генерирования гибридом из кроличьих В-клеток хорошо известны в данной области и

описаны, например, в заявке на патент США 2005/0033031.

**Получение анти-VEGF-иммуносвязывающих агентов**

Антитела или производные антител по изобретению могут быть получены обычными способами в области рекомбинантной генетики. На основании информации об этих последовательностях этих полипептидов, кДНК, кодирующие их, могут быть получены посредством синтеза генов ([www.genscript.com](http://www.genscript.com)). Эти кДНК могут быть клонированы в подходящие векторные плазмиды. После получения ДНК, кодирующей VL- и/или VH-домен, может выполняться сайт-направленный мутагенез, например, при помощи ПЦР с использованием мутагенных праймеров, с получением различных производных. Наилучшая "исходная последовательность" может быть выбрана в зависимости от изменений, желаемых в этих VL- и/или VH- последовательностях.

Способы введения или трансплантации CDR в каркасные районы включают в себя способы, приведенные, например, в Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033; U.S. Patent № 5225539 to Winter, и патентах США с номерами 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 to Queen et al., а также описанные в предварительной заявке США 61/075697, "Гуманизация кроличьих антител с использованием универсальных каркасов антител", поданной 25 июня 2008 года.

Стандартные способы клонирования и мутагенеза, хорошо известные специалисту в данной области, могут быть использованы для присоединения линкеров, перетасовки доменов или создания конструкции для получения Fab-фрагментов. Основные протоколы, описывающие общие способы по изобретению, описаны в Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook & Russell, 3<sup>rd</sup> ed. 2001) и в Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., 1999).

ДНК-последовательность, несущую ген, кодирующий полипептид scFv, или в случае Fab-фрагментов, кодирующую либо два отдельных гена, либо бицистронный оперон, содержащий два гена для слияний VL-Ск и VH-СН1, клонируют в подходящий экспрессирующий вектор, предпочтительно вектор с индуцируемым промотором. Следует обратить внимание на то, присутствует ли перед каждым геном подходящий сайт связывания рибосом, который гарантирует трансляцию. Должно быть понятно, что антитела по настоящему изобретению содержат описанные последовательности, а не состоят из них. Например, стратегии клонирования могут требовать создания конструкции, из которой может быть получено антитело с одним или несколькими дополнительными остатками на N-концевой стороне. Конкретно, метионин, происходящий из стартового кодона, может присутствовать в конечном белке в случаях, когда он не был отщеплен посттрансляционно. Большинство конструкций для scFv-антител имеют дополнительный аланин на N-концевой стороне. В предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению, выбран экспрессирующий вектор для периплазматической экспрессии в *E. coli* (Krebber, 1997). Указанный вектор содержит промотор перед отщепляемой сигнальной последовательностью. Затем кодирующую последовательность для этого пептида антитела сливают в рамке считывания с отщепляемой сигнальной последовательностью. Это позволяет нацеливать экспрессируемый полипептид на бактериальную периплазму, в которой отщепляется эта сигнальная последовательность. Затем антитело укладывается. В случае Fab-фрагментов, слитые пептиды как VL-Ск, так и VH-СН1 должны быть связаны с сигналом экспорта. После достижения этими пептидами периплазмы, образуется ковалентная связь S-S при C-концевых цистеинах. Если предпочтительной является цитоплазматическая экспрессия антител, указанные антитела обычно могут быть

получены при высоких выходах из телец включения, которые могут быть легко отделены от других клеточных фрагментов и клеточного белка. В этом случае, эти тельца включения солибилизируют в денатурирующем агенте, таком как, например, гидрхлорид гуанидина (GndHCl), и затем повторно укладывают при помощи процедур ренатурации, хорошо известных специалистам в данной области.

Плазмиды, экспрессирующие scFv или Fab-полипептиды вводят в подходящего хозяина, предпочтительно, бактериальную, дрожжевую клетку или клетку млекопитающего, наиболее предпочтительно, в подходящий штамм *E. coli*, например, JM83, для периплазматической экспрессии или в BL21 для экспрессии в тельцах включения. Этот полипептид может быть собран либо из периплазмы, либо из телец включения и очищен с использованием стандартных способов, таких как ионообменная хроматография, хроматография обращенной фазой, аффинная хроматография и/или гель-фильтрация, известных специалисту в данной области.

Антитела или производные антител по настоящему изобретению могут быть охарактеризованы в отношении выхода, растворимости и стабильности *in vitro*. Связывающие способности в отношении VEGF, предпочтительно против VEGF человека, могут быть тестированы *in vitro* при помощи ELISA или резонанса поверхностных плазмонов (BIAcore), с использованием рекомбинантного VEGF человека, как описано в WO9729131, причем последний способ позволяет также определять константу скорости диссоциации  $k_{off}$ , которая должна быть предпочтительно менее  $10^{-3} \text{ c}^{-1}$ .

Предпочтительными являются величины  $K_d \leq 10 \text{ нМ}$ .

Кроме антител с сильной связывающей аффинностью в отношении VEGF человека, желательны также отобрать антитела против VEGF, которые имеют и другие благоприятные свойства с точки зрения терапевтической перспективы. Например, это антитело может быть антителом, которое ингибирует рост клеток HUVEC в ответ на VEGF (см. пример 3). В одном из вариантов осуществления, это антитело может быть способным ингибировать пролиферацию клеток HUVEC в ответ на почти максимальную эффективную концентрацию VEGF (0,08 нМ). Предпочтительно, это антитело имеет величину эффективной дозы 50 ( $ED_{50}$ ), не большую, чем приблизительно 5 нМ, предпочтительно не большую, чем приблизительно 1 нМ, предпочтительно не большую, чем приблизительно 1 нМ, предпочтительно не большую, чем приблизительно 0,5 нМ и наиболее предпочтительно, не большую, чем приблизительно 0,06 нМ, для ингибирования VEGF-индуцированной пролиферации эндотелиальных клеток в этом "анализе роста эндотелиальных клеток", т.е. при этих концентрациях это антитело способно ингибировать VEGF-индуцированный рост эндотелиальных клеток *in vitro*, например, на 50% или более.

#### ***Биспецифические молекулы***

В другом аспекте, изобретение относится к биспецифическим молекулам, содержащим антитело против VEGF, или его фрагмент, по изобретению. Антитело по изобретению, или его антигенсвязывающие части, могут быть преобразованы путем введения функциональных групп или связаны с функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом для рецептора) с получением биспецифической молекулы, которая связывается по меньшей мере с двумя различными сайтами связывания или молекулами-мишенями. Антитело по изобретению может быть преобразовано путем введения функциональных групп или связано с функциональной молекулой с получением биспецифической молекулы, которая связывается по меньшей мере с двумя различными сайтами связывания и/или

молекулами-мишенями; такие мультиспецифические молекулы также предназначены для включения в термин "биспецифическая молекула" в контексте настоящей заявки. Для создания биспецифической молекулы по изобретению, антитело по изобретению может быть функционально связано (например, химическим связыванием, генетическим слиянием, нековалентной ассоциацией или иным образом) с одной или несколькими другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, опухолеспецифические или патогенспецифические антигены, пептид или связывающий миметик, так что возникает биспецифическая молекула. Таким образом, изобретение включает биспецифические молекулы, содержащие по меньшей мере одну первую связывающую молекулу, имеющую специфичность в отношении VEGF, и вторую связывающую молекулу, имеющую специфичность в отношении одного или нескольких дополнительных эпитопов-мишеней.

В одном из вариантов осуществления, биспецифические молекулы по настоящему изобретению содержат специфичность связывания по меньшей мере одного антитела, или фрагмента этого антитела, в том числе, например, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv или одноцепочечного Fv. Это антитело может быть димером легкой цепи или тяжелой цепи или любым его минимальным фрагментом, таким как Fv или одноцепочечная конструкция, как описано в работе Ladner et al. патент США 4946778, содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Хотя предпочтительными являются моноклональные антитела, другими антителами, которые могут быть использованы в биспецифических молекулах по настоящему изобретению, являются мышинные, химерные и гуманизированные моноклональные антитела.

Биспецифические молекулы по изобретению могут быть получены конъюгацией связывающих компонент специфичностей с использованием известных в данной области способов. Например, каждая связывающая специфичность биспецифической молекулы может быть генерирована отдельно и затем они могут быть конъюгированы одна с другой. Когда этими связывающими специфичностями являются белки или пептиды, для ковалентной конъюгации могут быть использованы связывающие или сшивающие агенты. Примеры сшивающих агентов включают в себя белок А, карбодиимид, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci USA 82:8648). Другие способы включают в себя способы, описанные в Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. № 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83, и Glennie et al. (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375). Предпочтительными конъюгирующими агентами являются SATA и сульфо-SMCC, оба из которых доступны из Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Если эти связывающие специфичности являются антителами, то могут быть конъюгированы через образование сульфгидрильных связей, например, через шарнирные области C-концов двух тяжелых цепей или другие сайты, независимо от того, являются ли они природно-встречающимися или вводятся искусственно. В особенно предпочтительном варианте осуществления, шарнирную область модифицируют таким образом, что она содержит нечетное число сульфгидрильных остатков, предпочтительно один остаток, перед конъюгацией.

Альтернативно, обе связывающие специфичные части могут кодироваться в одном и том же векторе и экспрессироваться и собираться в одной и той же клетке-хозяине.

Этот способ особенно эффективен, когда биспецифическая молекула представляет собой слитый белок mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')<sub>2</sub> или лиганд x Fab.

Биспецифическая молекула по настоящему изобретению может быть одноцепочечной молекулой, содержащей одноцепочечное антитело и детерминанту связывания, или одноцепочечной биспецифической молекулой, содержащей две детерминанты связывания. Биспецифические молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Далее, биспецифической молекулой может быть scFv, который специфически связывается с первой мишенью, причем VH и VL указанного scFv связаны с гибким линкером, содержащим домен, обеспечивающий специфическое связывание со второй мишенью. Подходящие линкеры описаны в предварительной заявке США № 60/937820. Способы получения биспецифических молекул описаны, например, в патенте США № 5260203; патенте США № 5455030; патенте США № 4881175; патенте США № 5132405; патенте США № 5091513; патенте США № 5476786; патенте США № 5013653; патенте США № 5258498 и патенте США № 5482858.

Связывание биспецифических молекул с их специфическими мишенями может быть подтверждено, например, твердофазным иммуоферментным анализом (ELISA), радиоиммуноанализом (RIA), FACS-анализом, биоанализом (например, ингибирования роста) или иммуноблот-анализом. Каждый из этих анализов обычно детектирует присутствие представляющих особый интерес комплексов белок-антитело с использованием меченого реагента (например, антитела), специфического для этого представляющего интерес комплекса. Например, комплексы антитела против VEGF могут быть детектированы с использованием, например, фермент-связанного антитела или фрагмента антитела, которое узнает комплексы антитело-VEGF и специфически связывается с комплексами антитело-VEGF. Альтернативно, эти комплексы могут быть радиоактивно мечеными и использоваться в радиоиммуноанализе (RIA) (см., например, статью Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки). Радиоактивный изотоп может быть детектирован такими способами, как применение  $\gamma$ -счетчика или сцинтилляционного счетчика, или автордиографией.

#### ***Иммуноконъюгат***

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к антителу против VEGF, или его фрагменту, конъюгированному с терапевтической частью молекулы, такой как цитотоксин, лекарственное средство (например, иммуносупрессор) или радиотоксин. Такие конъюгаты называют в данном случае "иммуноконъюгатами".

Иммуноконъюгаты, которые включают в себя один или несколько цитотоксинов, называют "иммунотоксинами". Цитотоксин или цитотоксический агент включает любой агент, который является вредным для клеток (например, убивает клетки). Примеры включают в себя таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропанолаол и пуромицин и их аналоги или гомологи. Терапевтические агенты включают в себя также, например, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацилдекарбазин), алкилирующие агенты (например, меклоретамин, тиоепа хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклотосфамид, бусульфамид, дибромоманнит, стрептозоцин, митомицин С и цис-дихлордиамин-платину (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин

(ранее дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС)), и антимиотические агенты (например, винкристин и винбластин).

Другие предпочтительные примеры терапевтических цитотоксинов, которые могут быть конъюгированы с антителом по настоящему изобретению, включают в себя дуокармицины, калихеамицины, майтансины и ауристатины и их производные. Примером конъюгата калихеамицин-антитело является коммерчески доступный Mylotarg™ (Wyeth-Ayerst).

Цитотоксины могут быть конъюгированы с антителами по настоящему изобретению с использованием линкерной технологии, доступной в данной области. Примеры типов линкеров, которые использовали для конъюгирования цитотоксина с антителом, включают в себя, но не ограничиваются ими, гидразоны, тиоэфиры, эфиры, дисульфиды и пептидсодержащие линкеры. Может быть выбран линкер, который, например, является чувствительным к расщеплению низким рН в лизосомном компартменте, или чувствительным к расщеплению протеазами, таким как протеазы, преимущественно экспрессируемые в опухолевой ткани, такие как катепсины (например, катепсины В, С, D).

В отношении дополнительного обсуждения типов цитотоксинов, линкеров и способов конъюгирования терапевтических агентов с антителами, см. также Saito, G. et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. et al. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Антитела по настоящему изобретению могут быть также конъюгированы с радиоактивным изотопом для получения цитотоксических радиофармацевтических веществ, также называемых радиоиммуноконъюгатами. Примеры радиоактивных изотопов, которые могут быть конъюгированы с антителами для диагностического или терапевтического использования, включают в себя, но не ограничиваются ими, иод<sup>131</sup>, индий<sup>111</sup>, иттрий<sup>90</sup> и лютеций<sup>177</sup>. Способы получения радиоиммуноконъюгатов установлены в данной области. Примеры радиоиммуноконъюгатов являются коммерчески доступными, в том числе Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) и Vexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), и сходные способы могут быть использованы для получения радиоиммуноконъюгатов с использованием антител по настоящему изобретению.

Конъюгаты антител по настоящему изобретению могут быть использованы для модификации конкретной биологической реакции, и эта лекарственная часть молекулы не должна рассматриваться как ограничиваемая классическими химическими терапевтическими агентами. Например, эта лекарственная часть может быть белком или полипептидом, обладающим желаемой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, ферментативно активный токсин, или его активные фрагменты, такой как абрин, ризин А, экзотоксин псевдомонасы или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухолей или интерферон-γ; или модификаторы биологической реакции, такие как, например, лимфокины, интерлейкин-1 ("IL-1"), интерлейкин-2 ("IL-2"), интерлейкин-6 ("IL-6"), гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор ("GM-CSF"), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор ("G-CSF") или другие факторы роста.

Способы конъюгации такой терапевтической части с антителами хорошо известны, см., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan

R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) и Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

***Применения антител против VEGF***

Для терапевтического использования, антитела против VEGF по изобретению вводят млекопитающему, предпочтительно, человеку, в фармацевтически приемлемой лекарственной форме, такой как формы, обсуждаемые в данном случае, в том числе в форме, которая может вводиться человеку внутривенно, в виде болюса или непрерывной инфузией на протяжении некоторого периода времени, местным, внутриглазным, внутримышечным, внутрибрюшинным, интрацереброспинальным, подкожным, внутрисуставным, внутрисиновиальным, интрастекальным, пероральным или ингаляционным способами. Эти антитела могут также удобным образом вводиться внутриопухолевым, околоопухолевым способами введения, введением в повреждение или введением около повреждения, для вызывания местных, а также системных терапевтических эффектов. Ожидается, что внутрибрюшинный способ особенно эффективен, например, для лечения опухолей яичников.

Для профилактики или лечения заболевания, подходящая доза антитела будет зависеть от типа подлежащего лечению заболевания, определенного выше, тяжести и течения этого заболевания от того, вводится ли это антитело для профилактической или терапевтической целей, предыдущей терапии, клинической истории пациента и реакции на это антитело и от решения лечащего врача. Это антитело вводят удобным образом пациенту один раз или на протяжении ряда обработок.

Антитела против VEGF могут использоваться для лечения VEGF-опосредованных заболеваний, описанных в настоящем описании. Например, возрастная дегенерация желтого пятна (AMD) является главной причиной тяжелой потери зрения в пожилой популяции. Экссудативная форма AMD характеризуется хороидальной неоваскуляризацией и отслойкой ретинальных пигментных эпителиальных клеток. Поскольку хороидальная неоваскуляризация ассоциируется с разительным ухудшением прогноза, антитела против VEGF по настоящему изобретению особенно полезны в уменьшении тяжести AMD. Прогресс этой терапии может быть легко подвергнут мониторингу общепринятыми способами, включающими в себя офтальмоскопию, микроскопию глазного дна и глазную компьютерную томографию.

Рассматриваются все одобренные FDA (Департаментом по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (США)) дозы и схемы лечения, подходящие для применения с Lucentis. Другие дозы и схемы лечения описаны в предварительной заявке США с порядковым номером 61/075641, "Улучшенные препараты иммуносвязывающего агента и способы введения", поданной 25 июня 2008 года, и предварительной заявке США № 61/058504, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки.

Согласно другому варианту по настоящему изобретению, эффективность этого антитела для профилактики или лечения заболевания может быть улучшена введением этого антитела последовательно или в комбинации с другим агентом, который является эффективным для этих целей, такого как фактор некроза опухолей (TNF), антитело,

способное ингибировать или нейтрализовать ангиогенную активность кислого или основного фактора роста фибробластов (FGF) или фактора роста гепатоцитов (HGF), антитело, способное ингибировать или нейтрализовать коагулянтные активности тканевого фактора, белка С или белка S (см. Esmon et al., патентная публикация РСТ № WO 91/01753, опубликованная 21 февраля 1991), антитело, способное связываться с рецептором HER2 (см. Hudziak et al., патентная публикация РСТ № WO 89/06692, опубликованная 27 июля 1989), или один или несколько общепринятых терапевтических средств, таких как, например, алкилирующие агенты, фотокоагулянты (такие как вертепорфин), антагонисты фолиевой кислоты, антиметаболиты метаболизма нуклеиновых кислот, антибиотики, пиримидиновые аналоги, 5-фторурацил, цисплатин, пуриновые нуклеозиды, амины, аминокислоты, триазолнуклеозиды или кортикостероиды. Такие другие агенты могут присутствовать во вводимой композиции или могут вводиться отдельно. Кроме того, это антитело предпочтительно вводят последовательно или в комбинации с радиологическими обработками, независимо от того, включают ли они облучение или введение радиоактивных веществ.

Антитела по изобретению могут быть использованы в качестве агента аффинной очистки. В этом способе, эти антитела иммобилизуют на твердой фазе, такой как смола Сефадекс, или на фильтровальной бумаге, с использованием способов, хорошо известных в данной области. Это иммобилизованное антитело контактирует с пробой, содержащей подлежащий очистке белок VEGF (или его фрагмент), и после этого этот носитель промывают подходящим растворителем, который будет удалять по существу весь материал в этой пробе, за исключением белка VEGF, который связан с иммобилизованным антителом. Наконец, этот носитель промывают другим подходящим растворителем, таким как глициновый буфер, рН 5,0, который будет высвобождать белок VEGF из этого антитела.

Антитела против VEGF могут быть также эффективны в диагностических анализах на белок VEGF, например, детектировании его экспрессии в конкретных клетках, тканях или сыворотке. Такие диагностические анализы могут быть использованы в диагностике рака.

Для диагностических применений, это антитело обычно метят детектируемой частью молекулы. Доступны многочисленные метки, которые могут быть обычно сгруппированы в следующие категории:

(а) Радиоизотопы, такие как  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  или  $^{35}\text{S}$ . Это антитело может быть помечено радиоизотопом с использованием способов, описанных, например, в Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991), и радиоактивность может быть измерена с использованием сцинтилляционного счета.

(b) Доступными являются флуоресцентные метки, такие как хелаты редкоземельных металлов (хелаты европия), или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, Лиссамин, фикоэритрин и Техасский Красный. Эти флуоресцентные метки могут быть конъюгированы с этим антителом с использованием способов, описанных, например, в Current Protocols in Immunology, выше. Флуоресценция может быть определена количественно с использованием флуориметра.

(с) Доступными являются различные фермент-субстратные метки и патент США № 4275149 обеспечивает обзор некоторых из них. Этот фермент обычно катализирует химическое изменение хромогенного субстрата, которое может быть измерено при помощи разных способов. Например, этот фермент может катализировать изменение окраски в субстрате, которое может быть измерено спектрофотометрически.

Альтернативно, этот фермент может изменять флуоресценцию или хемилюминесценцию этого субстрата. Способы количественного измерения изменения флуоресценции описаны выше. Хемилюминесцентный субстрат становится электронно возбужденным посредством химической реакции и может затем испускать свет, который может быть измерен (например, при помощи хемилюминометра) или передает энергию флуоресцентному акцептору. Примеры ферментативных меток включают в себя люциферазы (например, люциферазу светляка и бактериальную люциферазу; патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофталазиндионы, малатдегидрогеназу, уреазу, пероксидазу, например, пероксидазу хрена (HRPO), щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу, глюкоамилазу, лизоцим, сахаридоксидазы (например, глюкозооксидазу, галактозооксидазу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу), гетероциклические оксидазы (такие как уриказа и ксантинооксидаза), лактопероксидазу, микропероксидазу и т.п. Способы конъюгирования ферментов с антителами описаны в O'Sullivan et al., *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, in *Methods in Enzym.* (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166 (1981). Примеры фермент-субстратных комбинаций включают в себя, например:

- (i) Пероксидазу хрена (HRPO) с пероксидом водорода в качестве субстрата, где эта водородпероксидаза окисляет предшественник красителя (например, гидрохлорид ортофенилендиамина (OPD) или гидрохлорид 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ));
- (ii) щелочную фосфатазу (AP) с пара-нитрофенилфосфатом в качестве хромогенного субстрата; и;
- (iii) бета-D-галактозидазу (бета-D-Gal) с хромогенным субстратом (например, П-нитрофенил-бета-D-галактозидазой) или флуорогенным субстратом 4-метилумбеллиферил-бета-D-галактозидазой.

В другом варианте осуществления по настоящему изобретению, антитело против VEGF не должно быть меченым, и его присутствие может быть детектировано с использованием меченого антитела, которое связывается с антителом против VEGF

Антитела по изобретению могут быть использованы в любом известном способе анализа, таком как анализы конкурентного связывания, прямые и опосредованные сэндвич-анализы и анализы иммунопреципитации. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Анализ конкурентного связывания основан на способности меченого стандарта конкурировать с аналитом тест-пробы за связывание с ограниченным количеством антитела. Количество белка VEGF в этой тест-пробе обратно пропорционально количеству стандарта, который становится связанным с этими антителами. Для облегчения определения количества стандарта, который становится связанным, эти антитела обычно являются несолубилизованными перед конкуренцией или после конкуренции, так что стандарт и аналит, которые связаны с этими антителами, могут быть удобным образом отделены от стандарта и аналита, которые остаются несвязанными.

Сэндвич-анализы включают использование двух антител, каждое из которых способно связываться с отличающейся иммуногенной частью, или эпитопом детектируемого белка. В сэндвич-анализе, тест-проба аналита связывается первым антителом, который иммобилизован на твердом носителе, и после этого второе антитело связывается с этим аналитом, образуя нерастворимый состоящий из трех частей комплекс. См., например, патент США № 4376110. Это второе антитело само может быть меченым детектируемой частью молекулы (прямой сэндвич-анализ) или может быть измерено с использованием анти-иммуноглобулин-антитела, которое помечено

детектируемой частью молекулы (непрямой сэндвич-анализ). Например, одним типом сэндвич-анализа является анализ ELISA, в котором детектируемой частью молекулы является фермент.

Для иммуногистохимии, проба опухоли может быть свежей или замороженной или может быть залита в парафин и фиксирована консервантом, таким как, например, формалин.

Эти антитела могут быть также использованы для диагностических анализов *in vivo*. Обычно, антитело метят радионуклидом (таким как  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  или  $^{35}\text{S}$ ), так что опухоль может быть локализована с использованием иммуносцинтиграфии.

Антитело по изобретению может быть обеспечено в наборе, упакованной комбинации реагентов в заранее заданных количествах с инструкциями в отношении выполнения этого диагностического анализа. Если это антитело помечено ферментом, набор будет включать в себя субстраты и кофакторы, требуемые для этого фермента (например, предшественник субстрата, который обеспечивает детектируемый хромофор или флуорофор). Кроме того, могут быть включены другие добавки, такие как стабилизаторы, буферы (например, блокирующий буфер или лизисный буфер) и т.п. Относительные количества различных реагентов могут широко варьироваться для обеспечения концентраций в растворе этих реагентов, которые существенно оптимизируют чувствительность этого анализа. В частности, эти реагенты могут быть обеспечены в виде сухих порошков, обычно лиофилизированных, включающих в себя эксципиенты, которые при растворении будут обеспечивать раствор реагентов, имеющий подходящие концентрации.

#### ***Фармацевтические препараты***

В одном из аспектов изобретение относится к фармацевтическим готовым формам, содержащим антитела против VEGF для лечения VEGF-опосредованных заболеваний. Термин "фармацевтическая композиция" относится к препаратам, которые находятся в такой форме, которая позволяет биологической активности этого антитела или производного антитела быть явно эффективной, и которые не содержат дополнительных компонентов, которые являются токсичными в отношении индивидов, которым должна быть введена эта готовая форма. "Фармацевтически приемлемыми" эксципиентами (носителями, добавками) являются эксципиенты, которые могут быть обоснованно введены индивиду-млекопитающему для обеспечения эффективной дозы используемого активного ингредиента.

"Стабильной" готовой формой является форма, в которой это антитело или производное антитела по существу сохраняет его физическую стабильность и/или химическую стабильность и/или биологическую активность при хранении. Различные аналитические способы измерения стабильности белка доступны в данной области и обсуждаются, например, в обзоре Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) и Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). Стабильность может быть измерена при выбранной температуре в течение выбранного периода времени. Предпочтительно, эта готовая форма является стабильной при комнатной температуре (приблизительно 30°C) или при 40°C в течение по меньшей мере 1 недели и/или стабильной при приблизительно 2-8°C в течение по меньшей мере 3 месяцев - 2 лет. Кроме того, эта готовая форма является предпочтительно стабильной после замораживания (например, до -70°C) и оттаивания этой готовой формы.

Антитело или производное антитела "сохраняет его физическую стабильность" в

фармацевтической готовой форме, если оно удовлетворяет определенным документальным указаниям в отношении агрегации, деградации, осаждения и/или денатурации после визуального обследования окраски и/или прозрачности или после измерения рассеивания УФ-света или посредством эксклюзионной хроматографии на основе размера или другими подходящими общепринятыми в данной области способами.

Антитело или производное антитела "сохраняет его химическую стабильность" в фармацевтической готовой форме, если химическая стабильность в конкретное время является такой, что этот белок может все еще сохранять его биологическую активность, как определено ниже. Химическая стабильность может быть оценена детектированием и количественным измерением химически измененных форм этого белка. Химическое изменение может включать в себя модификацию размера (например, клиппирование), которая может оцениваться с использованием, например, электрофореза в ДСН-ПААГ и/или масс-спектрометрии MALDI/TOF MS (использующей матрикс малых органических молекул для лазерной десорбционной-ионизационной/определяющей время полета ионов масс-спектрометрии (matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry)). Другие типы химического изменения включают в себя изменение заряда (например, встречающееся как следствие деамидирования), которое может оцениваться, например, ионообменной хроматографией.

Антитело или производное антитела "сохраняет его биологическую активность" в фармацевтической готовой форме, если биологическая активность этого антитела в конкретное время находится в пределах приблизительно 10% (в пределах ошибок этого анализа) биологической активности, проявляемой в момент приготовления этой фармацевтической готовой формы, например, при определении в анализе связывания антигена. Другие анализы "биологической активности" для антител объяснены в данном случае ниже.

Термин "изотоническая" обозначает, что представляющая интерес готовая форма имеет по существу такое же осмотическое давление, что и кровь человека. Изотонические готовые формы будут обычно иметь осмотическое давление от приблизительно 250 до 350 мОсм. Изотоничность может быть измерена с использованием, например, давления (упругости) пара или с использованием осмометра типа обледенения (ice-freezing).

"Полиол" является веществом со множественными гидроксильными группами и включает в себя сахара (редуцирующие и не редуцирующие сахара), сахароспирты и сахарокислоты. Предпочтительные в данном случае полиолы имеют молекулярную массу, которая меньше приблизительно 600 кД (например, в диапазоне от приблизительно 120 до приблизительно 400 кД). "Редуцирующий сахар" является сахаром, который содержит гемиацетальную группу, которая восстанавливает ионы металла или реагирует ковалентно с лизином и другими аминокислотами в белках, а "нередуцирующий сахар" является сахаром, который не имеет свойств редуцирующего сахара. Примерами редуцирующих сахаров являются фруктоза, манноза, мальтоза, лактоза, арабиноза, ксилоза, рибоза, рамноза, галактоза и глюкоза. Нередуцирующие сахара включают в себя сахарозу, трегалозу, сорбозу, меллицитозу и раффинозу. Примерами сахароспиртов являются маннит, ксилит, эритрит, трейтол, сорбит и глицерин. Что касается сахарокислот, они включают в себя глюконат и его соли металлов. Если желательно, чтобы эта готовая форма была стабильной при замораживании-оттаивании, этим полиолом предпочтительно является полиол, который не кристаллизуется при температурах замерзания (например,  $-20^{\circ}\text{C}$ ), так что он дестабилизирует антитело в этой готовой форме. Нередуцирующие сахара, такие как сахароза и трегалоза, являются предпочтительно полиолами в этом изобретении, причем

наиболее предпочтительной является трегалоза вследствие превосходящей стабильности раствора трегалозы.

В контексте настоящей заявки, "буфер" относится к забуференному раствору, который выдерживает изменения рН посредством действия его кислотно-основных конъюгированных компонентов. Буфер по настоящему изобретению имеет рН в диапазоне от приблизительно 4,5 до приблизительно 8,0; предпочтительно от приблизительно 5,5 до приблизительно 7. Примеры буферов, которые будут контролировать этот рН в данном диапазоне, включают в себя ацетатный (например, ацетат натрия), сукцинатный (такой как сукцинат натрия), глюконатный, гистидиновый, цитратный буферы и буферы других органических кислот. Когда желательной является стабильная к замораживанию-оттаиванию готовая форма, этот буфер предпочтительно не является фосфатным.

В фармакологическом смысле, в контексте настоящей заявки, "терапевтически эффективным количеством" антитела или производного антитела называют количество, эффективное для профилактики или лечения нарушения, для лечения которого является эффективным это антитело или производное этого антитела. "Заболевание/нарушение" является любым состоянием, которое могло бы выиграть от лечения этим антителом или производным этого антитела. Это состояние включает в себя хронические и острые нарушения или заболевания, в том числе те патологические состояния, которые предрасполагают это млекопитающее к рассматриваемому нарушению.

"Консервант" является соединением, которое может быть включено в эту готовую форму для существенного уменьшения бактериального действия в ней с облегчением посредством этого, например, приготовления готовой формы многоцелевого применения. Примеры потенциальных консервантов включают в себя хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония (смесь хлоридов алкилбензилдиметиламмония, в которых алкильные группы являются соединениями с длинной цепью), и хлорид бензетония. Другие типы консервантов включают в себя ароматические спирты, такие как фенол, бутиловый и бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехин, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол. Наиболее предпочтительным консервантом является в данном случае бензиловый спирт.

Настоящее изобретение обеспечивает также фармацевтические композиции, содержащие одно или несколько соединений антител или производных антител, вместе по меньшей мере с одним физиологически приемлемым носителем или эксципиентом. Фармацевтические композиции могут содержать, например, один или несколько из воды, буферов (например, нейтральный забуференный солевой раствор или забуференный фосфатом солевой раствор), этанол, минеральное масло, растительное масло, диметилсульфоксид, углеводы (например, глюкозу, маннозу, сахарозу или декстраны), маннит, белки, адъюванты, полипептиды или аминокислоты, такие как глицин, антиоксиданты, хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА, или глутатион и/или консерванты. Как отмечалось выше, в обеспеченные в данном случае фармацевтические композиции могут быть включены (но необязательно) и другие активные ингредиенты.

Носитель является веществом, которое может быть ассоциировано с антителом или производным антитела перед введением его пациенту, часто с целью контроля стабильности или биодоступности этого соединения. Носители для применения в таких готовых формах обычно являются биосовместимыми и могут также быть биodeградируемыми. Носители включают в себя, например, одновалентные или

многовалентные молекулы, такие как сывороточный альбумин (например, человека или коровы), яичный альбумин, пептиды, полилизин и полисахариды, такие как аминокдекстран и полиамидоамины. Носители включают в себя также материалы твердого носителя, такие как гранулы и микрочастицы, содержащие, например, 5 полилактат-полигликолат, поли(сополимер лактида с гликолидом), полиакрилат, латекс, крахмал, целлюлозу или декстран. Носитель может нести эти соединения различными путями, в том числе образованием ковалентной связи (непосредственно или через линкерную группу), нековалентным взаимодействием или в виде смеси.

Фармацевтические композиции могут быть приготовлены для любого подходящего 10 способа введения, в том числе, например, местного, перорального, назального, ректального или парентерального введения. В некоторых вариантах осуществления, предпочтительными являются композиции в форме, подходящей для местного применения, например, в виде глазных капель. Другие формы включают в себя, например, пилюли, таблетки, пастилки, лепешки, водные или масляные суспензии, 15 диспергируемые порошки или гранулы, эмульсию, жесткие или мягкие капсулы или сиропы или эликсиры. В других вариантах осуществления, обеспеченные в данном случае композиции могут быть приготовлены в виде лиофилизата. Термин парентеральные, в контексте настоящей заявки, включает в себя подкожную, внутрикожную, внутрисосудистую (например, внутривенную), внутримышечную, 20 спинальную, внутричерепную, внутриоболочечную и внутрибрюшинную инъекцию, а также любой подобный способ инъекции или инфузии.

Фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде стерильной инъекционной водной или масляной суспензии, в которой модулятор, в зависимости от используемых носителя и концентрации, либо суспендирован, либо растворен в этом 25 носителе. Такая композиция может быть приготовлена в соответствии с известной техникой с использованием подходящих диспергирующих, увлажняющих агентов и/или суспендирующих агентов, таких как вышеупомянутые агенты. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые могут быть использованы, находятся вода, 1,3-бутандиол, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в 30 качестве растворителя или суспендирующей среды могут быть использованы стерильные нелетучие масла. Для этой цели может быть использовано любое легкое нелетучее масло, включающее в себя синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, в приготовлении инъекционных композиций могут быть использованы жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, и в этом носителе могут быть растворены адъюванты, 35 такие как местные анестетики, консерванты и/или буферящие агенты.

Фармацевтические композиции могут быть приготовлены в виде готовых форм пролонгированного высвобождения (т.е. в виде такой готовой формы, как капсула, которая осуществляет медленное высвобождение модулятора после введения). Такие готовые формы могут быть обычно приготовлены с использованием хорошо известной 40 технологии и введены, например, перорально, ректально или подкожной имплантацией или имплантацией в желаемом участке-мишени. Носители для применения в таких готовых формах являются биосовместимыми и могут быть также биodeградируемыми; предпочтительно эта готовая форма обеспечивает относительно постоянный уровень высвобождения модулятора. Количество антитела или производного антитела, содержащееся в форме пролонгированного высвобождения, зависит, например, от участка имплантации, скорости и ожидаемой продолжительности высвобождения и природы подлежащего лечению или предупреждению заболевания/нарушения.

Антитело или производные антитела, обеспеченные в данном случае, обычно вводят

в количестве, которое дает концентрацию в общей воде организма (например, крови, плазме, сыворотке, CSF, синовиальной жидкости, лимфе, клеточной интерстициальной жидкости, слезах или моче), которая является достаточной для детектируемого связывания с VEGF и предотвращения или подавления VEGF-опосредованных заболеваний/нарушений. Доза считается эффективной, если она приводит к явной пользе пациента, как описано в данном случае. Предпочтительные системные дозы находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 140 мг на килограмм массы тела в день (приблизительно 0,5 мг - приблизительно 7 г на пациента в день), причем пероральные дозы обычно являются приблизительно в 5-20 раз более высокими, чем внутривенные дозы. Количество антитела или производного антитела, которое может быть объединено с материалами носителя для получения единой лекарственной формы, будет варьироваться в зависимости от хозяина, получающего лечение, и конкретного способа введения. Унифицированные (стандартные) лекарственные формы будут обычно содержать приблизительно 1 мг - приблизительно 500 мг активного ингредиента.

Фармацевтические композиции могут быть упакованы для лечения состояний, чувствительных к антителу или производному антитела, нацеленному на VEGF. Упакованные фармацевтические композиции могут включать в себя контейнер, содержащий эффективное количество по меньшей мере одного антитела или производного антитела, описанного в данном случае, и инструкции (например, этикетку), указывающие, что содержащаяся в контейнере композиция предназначена для применения для лечения заболевания/нарушения, отвечающего на антитело или производное антитела после введения пациенту.

Антитела или производные антител по настоящему изобретению могут быть также химически модифицированы. Предпочтительными модифицирующими группами являются полимеры, например, необязательно замещенный имеющий прямую или разветвленную цепь полиалкеновый, полиалкениленовый, или полиоксиалкиленовый полимер или разветвленный или неразветвленный полисахарид. Такая эффекторная группа может увеличивать период полужизни этого антитела *in vivo*. Конкретные примеры синтетических полимеров включают в себя необязательно замещенный имеющий прямую или разветвленную цепь поли(этиленгликоль) (ПЭГ), поли(пропиленгликоль), поли(виниловый спирт) или их производные. Конкретные природно-встречающиеся полимеры включают в себя лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производные. Размер этого полимера может варьироваться по желанию, но обычно будет находиться в диапазоне средней молекулярной массы 500 Да - 50000 Да. Для местного применения, в котором это антитело предназначено для проникновения в ткань, предпочтительная молекулярная масса этого полимера равна приблизительно 5000 Да. Эта молекула полимера может быть присоединена к антителу, в частности, к С-концевой стороне тяжелой цепи Fab-фрагмента, через ковалентно связанный пептид шарнирной области, как описано в WO 0194585. Что касается присоединения ПЭГ-частей, делается ссылка на "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnological and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York и "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York.

После приготовления представляющего интерес антитела или производного антитела, как описано в данном случае, готовят содержащую его фармацевтическую композицию. Антитело, которое должно быть приготовлено в виде этой композиции, не подвергали предшествующей лиофилизации, и представляющая интерес готовая форма является в данном случае водной готовой формой. Предпочтительно, антителом или производным

антитела в этой готовой форме является фрагмент антитела, такой как scFv.

Терапевтически эффективное количество антитела, присутствующее в этой готовой форме, определяют, например, с учетом желаемых объемов дозы и способа(ов) введения. Примерная концентрация антитела в этой готовой форме равна приблизительно 0,1 мг/мл - приблизительно 50 мг/мл, предпочтительно, приблизительно 0,5 мг/мл - приблизительно 40 мг/мл и наиболее предпочтительно, приблизительно 10 мг/мл - приблизительно 20 мг/мл.

Готовят водную готовую форму, содержащую антитело или производное антитела в рН-забуференном растворе. Буфер по настоящему изобретению имеет рН в диапазоне от приблизительно 4,5 до приблизительно 8,0, предпочтительно, от приблизительно 5,5 до приблизительно 7. Примеры буферов, которые будут контролировать рН в этом диапазоне, включают в себя ацетатный (например, ацетат натрия), сукцинатный (такой как сукцинат натрия), глюконатный, гистидиновый, цитратный буферы и буферы других органических кислот. Концентрация буфера может быть от приблизительно 1 мМ до приблизительно 50 мМ, предпочтительно от приблизительно 5 мМ до приблизительно 30 мМ, в зависимости, например, от этого буфера и желаемой изотоничности готовой формы.

В эту готовую форму включают полиол, который действует в качестве агента тоничности и может стабилизировать это антитело. В предпочтительных вариантах осуществления, эта готовая форма не содержит влияющего на тоничность количества соли, такой как хлорид натрия, так как оно может вызывать осаждение антитела или его производного и/или приводить к окислению при низком рН. В предпочтительных вариантах осуществления, полиол является нередуцирующим сахаром, таким как сахароза или трегалоза. Полиол добавляют к готовой форме в количестве, которое может варьироваться в зависимости от желаемой изотоничности этой готовой формы. Предпочтительно, эта водная готовая форма является изотонической, и в этом случае подходящие концентрации полиола в этой готовой форме находятся, например, в диапазоне от приблизительно 1% до приблизительно 15% м/о, предпочтительно в диапазоне от приблизительно 2% до приблизительно 10% м/о. Однако могут быть также подходящими гипертонические или гипотонические готовые формы. Количество добавляемого полиола может также изменяться в зависимости от молекулярной массы полиола. Например, может добавляться более низкое количество моносахарида (например, маннита) в сравнении с дисахаридом (таким как трегалоза).

К этой готовой форме антитела и/или производного антитела добавляют также поверхностно-активный агент. Примеры поверхностно-активных агентов включают в себя неионогенные поверхностно-активные агенты, такие как полисорбаты (например, полисорбаты 20, 80 и т.д.) или поллоксамеры (например, поллоксамер 188). Количество добавляемого поверхностно-активного агента является таким, что он уменьшает агрегацию приготовленного антитела/производного антитела и/или минимизирует образование частиц в этой готовой форме и/или уменьшает адсорбцию. Например, поверхностно-активный агент может присутствовать в этой готовой форме в количестве от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,5%, предпочтительно, от приблизительно 0,005% до приблизительно 0,2% и наиболее предпочтительно, от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1%.

В одном из вариантов осуществления, эта готовая форма содержит вышеуказанные агенты (т.е. антитело или производное антитела, буфер, полиол и поверхностно-активный агент) и является по существу свободной от одного или нескольких консервантов, таких как бензиловый спирт, фенол, м-крезол, хлорбутанол и хлорид

бензетония. В другом варианте осуществления, консервант может быть включен в эту готовую форму, особенно, когда эта готовая форма является многодозовой готовой формой. Концентрация консерванта может находиться в диапазоне от приблизительно 0,1% до приблизительно 2%, наиболее предпочтительно, от приблизительно 0,5% до 5  
10 приблизительно 1%. Один или несколько других фармацевтически приемлемых носителей, эксципиентов или стабилизаторов, таких как описанные в Remington's Pharmaceutical Sciences 21st edition, Osol, A. Ed. (2006), могут быть включены в готовую форму, при условии, что они не оказывают вредного действия на желаемые  
15 характеристики этой готовой формы. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозах и концентрациях и включают в себя: дополнительные буферящие агенты, соразтворители, антиоксиданты, в том числе аскорбиновую кислоту и метионин, хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА, комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок), биodeградируемые полимеры, такие как полиэфиры, и/или солеобразующие  
15 противоионы, такие как натрий.

Готовые формы, которые должны использоваться для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко осуществляется фильтрованием через мембраны стерильного  
фильтрования до или после приготовления этой готовой формы.

Готовую форму вводят млекопитающему, нуждающемуся в лечении этим антителом,  
20 предпочтительно человеку, в соответствии с известными способами, такими как внутривенное введение в виде болюса или непрерывной инфузии на протяжении некоторого периода времени, внутримышечным, внутривнутрибрюшинным, интрацеребральным, подкожным, внутрисуставным, внутрисиновиальным, интратекальным, пероральным, местным или ингаляционным способами. В  
25 предпочтительных вариантах осуществления эту готовую форму вводят млекопитающему местным внесением глазных капель на поверхность глаза. Для этих целей, эта готовая форма может вноситься при помощи, например, аппликатора для глазных капель.

Подходящая доза (“терапевтически эффективное количество”) этого антитела будет  
30 зависеть, например, от подлежащего лечению состояния, тяжести и течения этого состояния, от того, вводится ли это антитело для превентивной или терапевтической целей, предыдущей терапии, клинической истории пациента и реакции на это антитело, типа используемого антитела и от решения лечащего врача. Это антитело или производное антитела вводят подходящим образом этому пациенту один раз или на  
35 протяжении ряда обработок, и оно может вводиться этому пациенту в любое время от диагностики и далее. Это антитело или производное антитела может вводиться в виде единственного лекарственного средства обработки или вместе с другими лекарственными средствами или терапиями, применимыми в лечении рассматриваемого состояния.

В качестве обычного предложения, терапевтически эффективное количество антитела  
40 или производного антитела будет вводиться в диапазоне приблизительно 0,1 - приблизительно 50 мг/кг массы тела пациента посредством одного или нескольких введений, причем обычный диапазон используемого антитела равен приблизительно 0,3 - приблизительно 20 мг/кг, более предпочтительно, приблизительно 0,3 -  
45 приблизительно 15 мг/кг, вводимых, например, один раз в день. Однако могут быть применимы и другие схемы введения доз. Прогресс этой терапии может быть легко подвергнут мониторингу с использованием общепринятых способов.

Рассматриваются одобренные FDA (Департаментом по контролю за качеством

пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (США)) дозы и схемы лечения, подходящие для применения с Lucentis.

Другие дозы и схемы лечения описаны в предварительной заявке США с порядковым номером 61/075641 "Улучшенные препараты иммуносвязывающего агента и способы введения", поданной 25 июня 2008 года, которая особо включена в настоящее описание в качестве ссылки.

#### *Изделия*

В другом варианте осуществления настоящее изобретение, относится к изделию, содержащему контейнер, в котором находится водная фармацевтическая готовая форма по настоящему изобретению, и обеспечены инструкции для его использования. Подходящие контейнеры включают в себя, например, склянки, флаконы, аппликаторы глазных капель и шприцы. Этот контейнер может быть выполнен из различных материалов, таких как стекло или пластик. Примерным контейнером является одноразовый стеклянный или пластиковый флакон на 3-20 кубических сантиметров. Альтернативно, для многодозовой готовой формы этот контейнер может быть стеклянным флаконом на 3-100 см<sup>3</sup>. Этот контейнер содержит готовую форму, и этикетка на этом контейнере или приложенная к этому контейнеру может содержать инструкции для применения. Это изделие может дополнительно включать в себя другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включающие в себя другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши упаковки с инструкциями для применения.

#### *Пояснение примерами*

Данное описание дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые не должны рассматриваться в качестве дополнительного ограничения. Содержания всех фигур и всех ссылок, патентов и опубликованных заявок на патенты, цитируемых по всей этой заявке, специально включены в настоящее описание в качестве ссылки в их полном объеме.

Во всех этих примерах использовали следующие материалы и способы, если нет других указаний.

#### *Общие материалы и способы*

В общем, практика по настоящему изобретению использует, если нет других указаний, общепринятые способы химии, молекулярной биологии, технологии рекомбинантных ДНК, иммунологии (в частности, технологии антител) и стандартные способы получения полипептидов. См., например, Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow et al., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); и Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992).

#### *Измерения термостабильности*

Спектры, полученные с использованием спектроскопии ослабленного полного отражения/инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием (ATR-FTIR), получали для различных отдельных цепей и модифицированных молекул с использованием ячейки FT-IR Bio-ATR в тензоре (Bruker). Эти молекулы концентрировали до 3 мг/мл и диализовали в течение ночи при 4°C против PBS, pH 6,5, и протекающий поток буфера собирали в качестве «слепого» опыта. Профили денатурации получали термообработкой этих молекул широким диапазоном температур в 5°C-стадиях (25-95°C). Все манипуляции со спектрами выполняли с использованием

компьютерной программы OPUS. Фон основного буфера и транзиторный атмосферный фон ( $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ ) вычитали из спектра белка. Затем полученный спектр белка корректировали относительно фона и определяли спектры амида I белка из ширины самого широкого разделяемого пика в ожидаемой области. Спектры вторых производных получали для спектров полосы амида I с использованием полиномиальной (многочленной) функции третьей степени со сглаживающей функцией. Изменения в структуре белков оценивали анализом вторых производных амида I с использованием линейной калибровочной кривой для начальных расчетов подгонки кривой с предположением 0% денатурации для 3 более низких измерений и 100% денатурации для 3 более высоких измерений. Профили денатурации использовали для аппроксимирования средних точек термических развертывающих переходов (ТМ) для каждого варианта с применением сигмоидной модели Болтцмана.

#### *Измерения растворимости*

Относительную растворимость различных молекул scFv измеряли после усиления агрегации белка и осаждения в присутствии сульфата аммония. Сульфат аммония добавляли к этому белку в водном растворе с получением приращений 5% насыщения в конечной смеси соль-белок. Осаждение в динамическом диапазоне определяли эмпирически и интервалы насыщения уменьшали в этом диапазоне до насыщения с 2,5% интервалами в конечной смеси. После добавления сульфата аммония, пробы осторожно перемешивали и центрифугировали 30 минут при 6000 об/мин. Остающийся белок в супернатантах извлекали для каждого процента насыщения сульфата аммония. Кривые растворимости определяли измерением концентрации белка в супернатанте при помощи измерения UV-VIS (УФ-видимый свет) с использованием спектрофотометра NanoDrop™-1000. Измерения остающегося растворимого белка в супернатантах нормализовали и использовали для оценивания средних точек относительной растворимости для каждого варианта с применением сигмоидной модели Болтцмана.

#### *Краткосрочный тест стабильности*

Молекулы scFv испытывали после двухнедельной инкубации при 40°C на присутствие растворимых агрегатов и продукты деградации. Белки с концентрацией 10 мг/мл диализовали в течение ночи при 4°C против PBS с широким диапазоном pH (3,5, 4,5, 5,5, 6,5, 7,0, 7,5 и 8,5). Контрольные молекулы с той же самой концентрацией в стандартном буфере PBS (pH 6,5) хранили при -80°C на протяжении периода 2 недель. Определение полос деградации электрофорезом в ДСН/ПААГ выполняли при временных точках t=0 и t=14 дней и растворимые агрегаты оценивали в SEC-HPLC. Определение остающейся активности после 2 недель при 40°C выполняли при помощи Biacore.

### **ПРИМЕР 1**

#### **СТРАТЕГИЯ ИММУНИЗАЦИИ ДЛЯ ГЕНЕРИРОВАНИЯ АНТИТЕЛ ПРОТИВ VEGF**

В этом примере описывается стратегия иммунизации, которая использует новый антигенный VEGF-произведенный пептид, для генерирования антител, способных узнавать VEGFA человека, мыши и кролика.

Из исследований с использованием аланин-сканирующего мутагенеза, выполняемых в Genentech, известны остатки VEGFA, которые являются решающими для высокоаффинного взаимодействия с VEGFr (Fuh, G. et al., (2006) J. Biol Chem. 281, 6625-6631). Хотя этот рецепторсвязывающий сайт, возможно, представляет собой конформационный эпитоп, большинство этих решающих остатков лежат на альфа-спирали, на первых 10 аминокислотах зрелого VEGFA.

Кроличий VEGFA содержит три изменения аминокислот в этой альфа-спирали при сравнении с последовательностью человека; в отличие от этого, мышиный VEGFA является идентичным VEGFA человека в этом районе. Таким образом, для генерирования мышь-человек перекрестно реагирующих антител, кролик представляет подходящий вид для иммунизации. Кроме того, иммунизация кролика может привести к Ab с более высокой аффинностью, чем иммунизация мыши.

Как описано выше, взаимодействие с остатками на N-концевой альфа-спирали VEGFA, по-видимому, является наиболее важной для связывания с VEGFR1. Таким образом, этот состоящий из 10 аминокислот сегмент может быть использован в качестве эпитопа для иммунизации. Альтернативно, может быть инъецирован полноразмерный VEGFA, однако, другие пептидные сегменты на VEGFA являются более иммуногенными, понижая таким образом шанс индуцирования нейтрализующих антител. Эта гипотеза подтверждается тем фактом, что два разных пептида, оба из которых лежат вблизи C-конца VEGFA, являются потенциально иммуногенными, как спрогнозировано с помощью способа Johnson и Wolf. Этот способ прогнозирует только минорный иммуногенный потенциал для N-концевой альфа-спирали. Таким образом, иммунизация пептидом, составляющим только альфа-спираль, может быть более простой, чем иммунизация полноразмерным VEGFA. Вероятность индуцирования сильной иммунной реакции может быть дополнительно увеличена слиянием или химическим связыванием пептида гемоцианина морского моллюска (KLH).

Четыре стратегии иммунизации выполняли следующим образом

А. Предварительная иммунизация кроликов полноразмерным VEGFA<sub>165</sub> человека для усиления возможности получения конформационных связывающих агентов. Второй бустинг пептидом из сегмента аминокислот 16-KFMDVYQRSYC<sub>HP</sub>-28 (подчеркнутые: взаимодействие с рецептором; дважды подчеркнутые, дивергентные в кролике, Cys участвует в дисульфидной связи согласно структуре кристалла). Cys, содержащийся в этой пептидной последовательности, мог бы быть использован для связывания KLH и, следовательно, мог не быть экспонирован в виде свободного Cys. Конечный пептид мог бы выглядеть следующим образом: KFMDVYQRSY-Cys-KLH.

В. Предварительная иммунизация мышей полноразмерным VEGFA<sub>165</sub> для усиления возможности получения конформационных связывающих агентов. Второй бустинг пептидом из сегмента аминокислот 16- KFMDVYQRSYC<sub>HP</sub> -28 (Cys участвует в дисульфидной связи согласно структуре кристалла). Cys, содержащийся в этой пептидной последовательности, мог бы быть использован для связывания KLH и, следовательно, мог не быть экспонирован в виде свободного Cys. Конечный пептид мог бы выглядеть следующим образом: KFMDVYQRSY-Cys-KLH.

С. Предварительная иммунизация кроликов/мышей пептидом из сегмента KFMDVYQRSYC<sub>HP</sub> -28 (конечный пептид: KFMDVYQRSY-Cys-KLH). Второй бустинг полноразмерным VEGFA<sub>165</sub> для усиления вероятности получения конформационных связывающих агентов.

Д. Иммунизация полноразмерным VEGFA<sub>165</sub> в кроликах.

## ПРИМЕР 2

Трансплантация CDR и функциональная гуманизация моноклональных антител против VEGF

### Трансплантация кроличьих CDR

В отличие от традиционных способов гуманизации, которые используют акцепторный

каркас антитела человека, который имеет наибольшую гомологию последовательности с донорским антителом не человека, кроличьи CDR трансплантировали либо в каркас FW1.4 (SEQ ID NO: 172) для генерирования Min-graft, либо в модифицированный частями кроличьего антитела "rabbitized" каркас rFW1.4 (SEQ ID NO: 173) или его вариант rFW1.4 (v2) (SEQ ID NO: 174) для генерирования Max-graft. Оба каркаса отбирали сначала на желаемые функциональные свойства (растворимость и стабильность), структурную пригодность для вмещения большого разнообразия кроличьих CDR и приемлемую гомологию с кроличьей консенсусной последовательностью переменного домена. Каркас rFW1.4 является производным FW1.4, которое было дополнительно сконструировано с той целью, чтобы служить в качестве универсального акцепторного каркаса для фактически любого набора кроличьих CDR. Хотя стабильная и растворимая каркасная последовательность FW1.4 проявляет высокую гомологию с кроличьими антителами, она не является доступной наиболее гомологичной последовательностью.

#### *Идентификация остатков, потенциально участвующих в связывании*

Для каждой последовательности переменного домена кролика, идентифицировали ближайшую копию зародышевой линии кролика. Если эта ближайшая зародышевая линия не могла быть установлена, эту последовательность сравнивали против консенсуса этой подгруппы или консенсуса кроличьих последовательностей с высоким процентным сходством. Редкие каркасные последовательности считали возможным результатом соматической гипермутации и, следовательно, играющими роль в связывании антигена. Таким образом, такие остатки обсуждали для трансплантации на акцепторный каркас rFW1.4 или rFW1.4(v2) для генерирования Max-graft. В частности, остатки, потенциально участвующие в прямом контакте антигена или влияющие на размещение VL и VH, трансплантировали. Дополнительные остатки, описанные, как влияющие на структуру CDR, заменяли, если требовалось. При трансплантации CDR на FW1.4 (Min-grafts) не производили каркасных замен. Например, для генерирования остатка 578minmax VH 94 (H94), rFW1.4 мутировали в соответствующий остаток в донорской последовательности. Кроличье антитело 578 содержит Gly в H94, тогда как обе, наиболее гомологичная зародышевая линия, и кроличья консенсусная последовательность, содержат Arg в положении H94. Gly имеет исключительную гибкость (положительные углы  $\phi$ ), которая не обнаруживается в отношении других аминокислот. Это предполагает роль в угле закручивания основной цепи и возможное сильное влияние петлевой конформации с последствиями в отношении активности. Дополнительные примеры положений в каркасе, которые были трансплантированы для получения Max-graft, как описано в данном случае, могут быть идентифицированы сопоставлением последовательностей каркасных районов rFW1.4, rFW1.4(v2) и представляющих интерес обеспеченных в данном случае последовательностей scFv. Для указанной цели может быть использован инструментальный Web, известный в данной области (например, ClustalW, доступный с 23 июня 2009 года в <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> или MultiAlin, доступный с 23 июня 2009 года в <http://bioinfo.genotoul.fr/multalin>). Все положения каркаса, в которых rFW1.4 и rFW1.4(v2) содержат один и тот же остаток и в которых представляющий интерес scFv обнаруживает другой остаток, являются положениями каркаса, которые были трансплантированы для получения Max-graft.

#### *Перетасовка доменов*

Варибельные легкие цепи Min-graft комбинировали с переменной тяжелой цепью Max-graft для идентификации оптимальных комбинаций в отношении биофизических свойств (растворимости и стабильности) и активности.

#### *Клонирование и экспрессия scFv*

Описанные и охарактеризованные в данном случае scFvs получали следующим образом. Гуманизированные последовательности VL (SEQ ID NO: 82-106) соединяли с гуманизированными последовательностями VH (SEQ ID NO: 118-166) через линкер SEQ ID NO: 181 с получением scFv следующей ориентации: NH<sub>2</sub>-VL-linker-VH-COOH. Во

5 многих случаях ДНК-последовательности, кодирующие различные scFv, синтезировали de novo в предоставляющей услуги компании (SP-компании) Entelechon GmbH (www.entelechon.com). Полученные ДНК-инсерты клонировали в бактериальный экспрессирующий вектор pGMP002 через сайты рестрикции NcoI и HindIII, введенные в 5'- и 3'-конец ДНК-последовательности scFv, соответственно. Между ДНК-  
10 последовательностью VL-домена и VH-домена расположен сайт рестрикции BamHI. В некоторых случаях кодирующую scFv ДНК не синтезировали de novo, и экспрессирующие scFv конструкции клонировали перетасовкой доменов. Таким образом, VL-домены вырезали и вводили в новые конструкции через сайты рестрикции NcoI и BamHI, VH-  
15 домены через сайты рестрикции BamHI и HindIII. В других случаях точковые мутации вводили в VH- и/или VL-домен с использованием известных в данной области ПЦР-способов сборки. Клонирование GMP002 описано в примере 1 WO2008006235. Получение scFv выполняли аналогично получению ESBA 105, как описано в примере 1 WO2008006235.

### ПРИМЕР 3

#### 20 АНАЛИЗ VIACORE СВЯЗЫВАНИЯ анти-VEGF-scFv

В этом примере тестировали Viacore-связывающую способность scFvs и аффинность связывания измеряли с использованием примерного способа резонанса поверхностных плазмонов при помощи Viacore™-T100. VEGF-белки, тестируемые на связывание этими кандидатными scFv, в этом примере и последующих примерах, включают в себя  
25 очищенный экспрессируемый Escherichia coli рекомбинантный VEGF<sub>165</sub> человека (PeproTech EC Ltd.), рекомбинантный VEGF<sub>121</sub> человека (PeproTech EC Ltd.), рекомбинантный VEGF<sub>110</sub> человека (ESBATEch AG), рекомбинантный мышинный VEGF<sub>164</sub> (PeproTech EC Ltd.), рекомбинантный крысиный VEGF<sub>164</sub> (Biovision), рекомбинантный  
30 кроличий VEGF<sub>110</sub> (ESBATEch AG) и рекомбинантный PLGF человека (PeproTech EC Ltd.). Для эксперимента с использованием резонанса поверхностных плазмонов, биосенсорные чипы (микропроцессоры) из карбоксиметилированного декстрана (CM4, GE Healthcare) активировали гидрохлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил) карбодиимида и N-гидроксисукцинимидом в соответствии с инструкциями поставщика.  
35 Каждую из 6 различных форм VEGF, представленных выше, связывали с 1 из 4 разных проточных ячеек на сенсорном чипе CM4 с использованием стандартной процедуры связывания амина. Диапазоны реакций, полученных с этими иммобилизованными молекулами VEGF после связывания и блокирования, были равны ~250-500 единицам  
40 реакции (RU) для hVEGF<sub>165</sub>, ~200 RU для hVEGF<sub>110</sub>, hVEGF<sub>121</sub>, мышинового VEGF<sub>164</sub>, крысиного VEGF<sub>164</sub> и кроличьего VEGF<sub>110</sub> и ~400 RU для PLGF. 4-ую проточную ячейку каждого чипа обрабатывали подобным образом, за исключением того, что перед  
блокированием в них не иммобилизовали белки, и эту проточную ячейку использовали в качестве включенного в этот эксперимент эталона. Различные концентрации анти-  
45 VEGF-scFv (например, 90 нМ, 30 нМ, 10 нМ, 3,33 нМ, 1,11 нМ, 0,37 нМ, 0,12 нМ и 0,04 нМ) в буфере HBS-EP (0,01M HEPES, pH 7,4 или 5, 0,15M NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% поверхностно-активный агент P20) инъецировали в эти проточные ячейки при скорости потока 30 мкл/мин в течение 5 минут. Диссоциации анти-VEGF-scFv из VEGF на чипе

СМ4 давали протекать в течение 10 мин при 25°C. Генерировали сенсограммы для каждой пробы анти-VEGF-scFv после коррекции с использованием включенного в измерения эталона с последующим вычитанием пробы буфера. Среднюю (кажущуюся) константу скорости диссоциации ( $k_d$ ), среднюю константу скорости ассоциации ( $k_a$ ) и среднюю константу диссоциации в равновесном состоянии ( $K_D$ ) рассчитывали с использованием взаимно однозначной модели связывания Langmuir с применением версии 1.1 программы BIAcore T100 evaluation.

В качестве примерного результата, некоторые основные кандидатные анти-VEGF-scFv приведены в списке таблицы 7, показывающей их аффинность связывания с hVEGF<sub>165</sub>. Их эффективность в качестве ингибиторов VEGF, которая измеряется с использованием конкурентного ELISA VEGFR и/или HUVEC-анализа и описывается в последних примерах, показана также в таблице 7. Кривые кинетики некоторых примерных главных кандидатов, например, 511max и 578max, в отношении их связывания с hVEGF<sub>165</sub> иллюстрированы на фиг.1. Определяли также их константы аффинности ( $k_d$ ,  $k_a$  и  $K_D$ ). Некоторые главные кандидаты проявляют также видоспецифичность в их связывании с различными белками VEGF из различных источников. Например, некоторые данные аффинности, измеренные при pH 5 с использованием VEGF<sub>164</sub> мыши и крысы в качестве партера связывания, показаны в таблицах 8a и b. Один примерный главный кандидат, 578minmax, имеет  $K_D$  of 5,76E-10M и 7,48E-10M в его связывании с VEGF<sub>164</sub>, соответственно, при pH 5 (таблицы 8a и 8b) и 2,73E-11 и 2,19E-11 при pH 7,4 (данные не показаны). Эта видоспецифичность дополнительно иллюстрируется на фиг.4 в кинетических кривых и данных аффинности в отношении связывания между белками 578minmax и VEGF человека, мыши или крысы.

Наряду с видоспецифичностью в их связывании с VEGF из различных организмов, многие ведущие кандидатные scFv обнаруживают также различные аффинности связывания в отношении различных изоформ VEGF. Например, данные аффинности, измеренные при pH 5,0 для связывания нескольких scFv-кандидатов с VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>121</sub> и VEGF<sub>110</sub> человека, сравниваются в таблице 9. В тех же самых экспериментах использовали белок PIGF в качестве отрицательного контроля без способности связывания с этими кандидатными scFv. Различные кинетические кривые и данные аффинности, например, для связывания между 578Max и изоформами VEGF, иллюстрируются также на фиг.3.

Данное изобретение описывает также производные, происходящие из вышеупомянутых главных кандидатных анти-VEGF-scFv. Некоторые главные производные кандидатов 578 и 511, перечисленные в таблице 10, иллюстрируются в отношении их аффинности и эффективности (измеренных при pH 5,0). В этом эксперименте использовали BIAcore-измерение для аффинности этих производных в отношении hVEGF<sub>165</sub>, тогда как конкурентный ELISA hVEGFR2 и/или HUVEC-анализ использовали для определения их эффективности ингибирования VEGF (таблица 10). Три производных, 578max, 578minmax и 578 wt-His, дополнительно иллюстрированы в их кинетических кривых и данных аффинности в отношении связывания с hVEGF<sub>165</sub> на фиг.4.

Для производных главных кандидатов определяли их биофизические характеристики, и они представлены на фиг.5-7 и в таблице 11. Эти характеристики включают в себя, как показано в таблице 11,  $T_m$ , определенную при помощи FTIR, процент потери  $\beta$ -

складки или белка после инкубирования при 60°C в течение 30 мин, растворимость, определенную осаждением сульфатом аммония, выход рефолдинга во время процесса получения и уровни экспрессии в *E. coli*. Три производных, 578max, 578minmax и 578minmax\_DHP, характеризовали в отношении их термостабильности в их кривых разворачивания в зависимости от разных температур, посредством FT-IR (фиг.5).

Таблица 7

Обзор аффинности и эффективности главных кандидатов

ID	№ белка	Отн. активность hVEGF2, конк. ELISA (EC50 <sub>Luc</sub> [нМ]/EC50 <sub>рект</sub> [нМ])	Отн. активность hVEGF1, конк. ELISA (EC50 <sub>Luc</sub> [нМ]/EC50 <sub>рект</sub> [нМ])	Отн. активность в HUVEC-анализе (EC50 <sub>Luc</sub> [нМ]/EC50 <sub>рект</sub> [нМ])
375-min	857	0.3	нет данных	нет данных
375-max	873	0.6	нет данных	нет данных
509-min	854	1.0	2.9	нет данных
509-max	855	4.1	13	0.003
509-maxII	856	0.6	0.09	0.0009
511-min	801	4.9	0.7	0.0011
511-max	802	8.7	8	0.0179
534-min C-His	807	0.1	нет данных	нет данных
534-max	793	1.1	нет данных	0.0014
567-min	884	9.7	14.9/57	нет данных
567-max	874	4.1	15.7/ 54.5	0.0086
578-min	820	4.1	4.8	0.1001
578-max	821	9.6	35.5/ 51.6	1.483
610-min	882	0.1	нет данных	нет данных
610-max	883	0.4	нет данных	нет данных
435-min	944	0.03	нет данных	нет данных
435-max	945	7.6	0.00039	нет данных

(таблица 7, продолжение)

ID	Измерения Biacore (pH 5)			Измерения Biacore (pH 7.4)		
	hVEGF <sub>165</sub>			hVEGF <sub>165</sub>		
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
375-min	9.27E+05	5.01E-03	5.41E-09	> E+08	3.86E+00	не доступно
375-max	2.44E+06	6.55E-03	2.68E-09	5.09E+07	2.42E-01	4.74E-09
509-min	6.23E+05	1.14E-03	1.82E-09	3.52E+06	1.08E-02	3.06E-09
509-max	2.26E+06	2.72E-03	1.21E-09	1.42E+06	5.37E-04	3.78E-10
509-maxII	8.38E+05	2.82E-03	3.37E-09	7.59E+06	1.98E-02	2.61E-09
511-min	5.05E+05	1.28E-03	2.53E-09	6.75E+05	8.85E-04	1.31E-09
511-max	6.59E+05	4.40E-05	6.67E-11	8.00E+05	6.85E-05	8.56E-11
534-min C-His	2.71E+05	9.21E-03	3.41E-08	Нет данных	Нет данных	Нет данных
534-max	1.88E+06	1.73E-02	9.21E-09	1.06E+06	2.62E-03	2.47E-09
567-min	2.01E+06	4.61E-04	2.30E-10	1.11E+06	7.00E-04	6.31E-10
567-max	1.20E+06	2.26E-04	1.88E-10	1.17E+06	1.67E-04	1.43E-10
578-min	1.14E+06	1.03E-02	9.01E-09	1.11E+06	2.02E-04	1.81E-10
578-max	7.00E+05	3.07E-04	4.39E-10	1.58E+06	3.76E-05	2.37E-11
610-min	2.51E+05	2.65E-03	1.06E-08	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
610-max	5.09E+05	6.01E-04	1.18E-09	> E+08	3.57E+01	не доступно
435-min	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	4.95E+05	1.43E-02	2.89E-08
435-max	1.67E+05	7.55E-04	4.53E-09	1.13E+06	1.04E-04	9.22E-11

Таблица 8a

Видоспецифичность отобранных главных кандидатов (VEGF 164 мыши и крысы)

ID	№ белка	VEGF <sub>164</sub> мыши			VEGF крысы		
		ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)
509-min	854	6.14E+05	1.00E-03	1.63E-09	3.51E+05	8.44E-04	2.41E-09
509-max	855	4.09E+06	5.90E-03	1.45E-09	3.90E+06	6.45E-03	1.65E-09
<b>509-maxII</b>	<b>856</b>	<b>3.47E+07</b>	<b>6.01E-02</b>	<b>1.73E-09</b>	<b>1.47E+07</b>	<b>2.66E-02</b>	<b>1.81E-09</b>
511-min	801	6.25E+05	1.03E-03	1.64E-09	5.50E+05	1.12E-03	2.04E-09
511-max	802	7.53E+05	4.61E-05	6.13E-11	6.26E+05	6.63E-05	1.06E-10
567-min	884	2.06E+06	3.50E-04	1.70E-10	1.72E+06	4.80E-04	2.79E-10
567-max	874	1.64E+06	1.52E-04	9.29E-11	1.36E+06	2.03E-04	1.49E-10
578-min	820	1.40E+06	1.51E-02	1.07E-08	1.70E+06	1.82E-02	1.07E-08
578-max	821	1.03E+06	4.40E-04	4.29E-10	8.83E+05	5.28E-04	5.98E-10

Таблица 8b

Видоспецифичность отобранных разработанных кандидатов

ID	№ белка	Измерения Biacore VEGF <sub>164</sub> мыши			Относительные величины VEGF <sub>164</sub> мыши	
		ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)	(kd h <sub>VEGF165</sub> /kd <sub>mV EGF164</sub> )	(Kd h <sub>VEGF165</sub> /Kd <sub>m VEGF164</sub> )
578minmax	903	1,14E+06	6,57E-04	5,67E-10	0,8	1,1
578 minmax_FW1.4:DHP	961	1,10E+06	6,69E-04	6,08E-10	0,6	0,9
578minmaxT84N_V89L	1008	1,23E+06	1,88E-03	1,53E-09	1,0	1,0
578min_max T84N_V89L_DHP	1017	1,47E+06	2,16E-03	1,46E-09	1,4	1,8

(продолжение)

ID	№ белка	Измерения Biacore VEGF <sub>164</sub> мыши			Относительные величины VEGF <sub>164</sub> мыши	
		ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)	(kd h <sub>VEGF165</sub> /kd <sub>mV EGF164</sub> )	(Kd h <sub>VEGF165</sub> /Kd <sub>m VEGF164</sub> )
578minmax	903	8,58E+05	6,41E-04	7,48E-10	0,8	0,8
578 minmax_FW1.4:DHP	961	8,00E+05	6,76E-04	8,45E-10	0,6	0,7
578minmaxT84N_V89L	1008	8,02E+05	1,52E-03	1,89E-09	1,2	0,8
578min_max T84N_V89L_DHP	1017	1,04E+05	1,90E-03	1,82E-09	1,6	1,5

Таблица 9

Связывание отобранных главных кандидатов изоформ VEGF (VEGF<sub>121</sub> человека и hVEGF<sub>110</sub>)

ID	№ белка	hVEGF <sub>165</sub>			hVEGF <sub>110</sub>		
		ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
509-min	854	6.23E+05	1.14E-03	1.82E-09	2.87E+05	4.74E-04	1.65E-09
509-max	855	2.26E+06	2.72E-03	1.21E-09	6.48E+05	2.35E-04	3.63E-10
509-maxII	856	8.38E+05	2.82E-03	3.37E-09	9.01E+05	1.33E-03	1.48E-09
511-min	801	5.05E+05	1.28E-03	2.53E-09	6.19E+05	8.98E-04	1.45E-09
511-max	802	6.59E+05	4.40E-05	6.67E-11	4.05E+05	7.96E-05	1.97E-10
567-min	884	2.01E+06	4.61E-04	2.30E-10	1.52E+06	3.82E-05	2.51E-11
567-max	874	1.20E+06	2.26E-04	1.88E-10	1.00E+06	3.27E-05	3.27E-11
578-min	820	1.14E+06	1.03E-02	9.01E-09	9.15E+05	1.04E-02	1.14E-08
578-max	821	7.00E+05	3.07E-04	4.39E-10	5.23E+05	7.22E-04	1.38E-09

(продолжение)

ID	hVEGF <sub>121</sub>			PlGF
	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)	
509-min	3.54E+05	4.53E-04	1.28E-09	Нет связывания
509-max	7.42E+05	2.49E-04	3.35E-10	Нет связывания
509-maxII	8.97E+05	1.23E-03	1.37E-09	Нет связывания
511-min	7.78E+05	9.63E-04	1.24E-09	Нет связывания
511-max	4.67E+05	9.97E-05	2.14E-10	Нет связывания
567-min	1.89E+06	4.54E-05	2.41E-11	Нет связывания
567-max	1.13E+06	5.76E-05	5.11E-11	Нет связывания
578-min	9.61E+05	8.80E-03	9.16E-09	Нет связывания
578-max	5.87E+05	5.58E-04	9.50E-10	Нет связывания

Таблица 10

Обзор аффинности и эффективности главных производных (578 и 511)

ID	№ белка	Отн. активность hVEGF2, конк. ELISA (EC50 <sub>Luc</sub> [нМ] / EC50 <sub>тест</sub> [нМ])	Отн. активность в HUVEC-анализе (EC50 <sub>Luc</sub> [нМ] / EC50 <sub>тест</sub> [нМ]) hVEGF	Измерения Biacore hVEGF <sub>165</sub>		
				ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)
578 wildtype C-His	798	Нет данных	Нет данных	8.34E+05	1.69E-04	2.00E-10
578-min	820	4.1	0.1001	1.14E+06	1.03E-02	9.01E-09
578-max	821	9.6	0.94/1.0/1.2/1.2 (новая установка)	7.00E+05	3.07E-04	4.39E-10
578-max FW1.4_DHP	960		Нет данных	9.30E+05	2.48E-04	2.66E-10
578-minmax	903	8.4	1.6/1.4 (новая установка)	8.06E+05	5.04E-04	6.25E-10
578minmax FW1.4_DHP	961	16.5	0.78/1.9	7.11E+05	4.09E-04	5.76E-10
578-max-min	902	6.5	Нет данных	1.35E+06	8.83E-03	6.55E-09
578min_max T84N	991	Нет данных	Нет данных	7.21E+05	7.00E-04	9.71E-10
578min_max V89A	978	Нет данных	Нет данных	5.09E+05	6.12E-04	1.20E-09
578min_max V89L	980	Нет данных	Нет данных	8.75E+05	1.87E-03	2.13E-09
578min_max T84N_V89L	1008	8.4	Нет данных	1.13E+06	1.80E-03	1.59E-09
578min_max T84N_V89A	1009	7.5	Нет данных	8.01E+05	4.93E-04	6.15E-10
578min_max T84N_V89L_DHP	1017	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
578min_max T84N_V89A_DHP		Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
578max synth FW opt	950	Нет данных	Нет данных	1.35E+06	5.86E-04	4.33E-10
578min_max synthFW	997	7.2	Нет данных	1.23E+06	9.89E-04	8.03E-10
578max_min synthFW	990	Нет данных	Нет данных	1.55E+06	5.31E-03	3.42E-09
578min_max FW1. synth	1016	Нет данных	Нет данных	7.08E+05	7.02E-04	9.91E-10
511-min	801	4.9	0.0011	5.05E+05	1.28E-03	2.53E-09
511-max	802	8.7	0.0179	6.59E+05	4.40E-05	6.67E-11
511min_max	904	5.4	Нет данных	3.66E+05	1.02E-04	2.78E-10
511max_min	905	Нет данных	Нет данных	5.11E+05	7.54E-04	1.48E-09

Таблица 11

Обзор биофизических характеристик главных производных (578 и 511)

ID	№ белка	ТМ в Bio-ATR [°C]	% потери β-складки (Aquaspec 60°C)	Процент потери белка (осаждение при 60°C)
5	578-min	820	Нет данных	Нет данных
	578-max	821	70.36	16.20%
	578-max FW1.4_DHP	960	Нет данных	Нет данных
	578-minmax	903	71.12	10.99%
	578minmax FW1.4_DHP	961	70.18	14.82%
	578-max-min	902	Нет данных	Нет данных
10	578min_max T84N	991	70.78	20.30%
	578min_max V89A	978	63.23	48.22%
	578min_max V89L	980	68.15	38.99%
	578min_max T84N_V89L	1008	69	28.30%
15	578min_max T84N_V89A	1009	Нет данных	Нет данных
	578min_max T84N_V89L_DHP	1017	67.8	Нет данных
	578min_max T84N_V89A_DHP	1080	66.3	Нет данных
	578max synth FW opt	950	63.62	97.85%
20	578min_max synthFW	997	63.25	98.02%
	578max_min synthFW	990	Нет данных	Нет данных
	578min_max FW1. synth	1016	65.7	21.30%
25	511-min	801	Нет данных	Нет данных
	511-max	802	70.5	4.50%
	511min_max	904	Нет данных	Нет данных
	511max_min	905	Нет данных	Нет данных
567min	884	54	100.00%	100.00%

(продолжение)

30

35

40

45

ID	Растворимость согласно осаждению сульфатом аммония [EC <sub>50</sub> в % насыщения NH <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]	Производительность: выход рефолдинга [мг/л]	Уровень экспрессии в E. coli [относительные единицы]	
5	578-min	Нет данных	1.5	++
	578-max	27.24	12.5	+
	578-max FW1.4_DHP	Нет данных	11.6	+
	578-minmax	28.13	23.93	+++
	578minmax FW1.4_DHP	32.36	50.5	+++
10	578-max-min	Нет данных	4.5	+
	578min_max T84N	Нет данных	7.5	+++
	578min_max V89A	Нет данных	16	+++
	578min_max V89L	Нет данных	30	+++
	578min_max T84N_V89L	27.88	24	+++
15	578min_max T84N_V89A	Нет данных	22	+++
	578min_max T84N_V89L_DHP	30.80	36	+++
	578min_max T84N_V89A_DHP	30.70	30	+++
	578max synth FW opt	28.30	19.4	++
	578min_max_synthFW	30.05	24	+++
20	578max_min_synthFW	Нет данных	0.5	++
	578min_max_FWL_synth	25.10	28	+++
25	511-min	Нет данных	13.5	+++
	511-max	8.62	6.47	+++
	511min_max	Нет данных	3.75	+++
	511max_min	Нет данных	7	+++
	567min	20.70	16.5	+++

Некоторые производные, перечисленные на фиг.6, сравнивали в отношении их денатурации и осаждения после теплового стресса (например, при 50°C, 60°C или 70°C) в течение 30 минут. 578max, 578minmax и 578minmax\_DHP дополнительно иллюстрировали в отношении их растворимости, которую определяли посредством осаждения сульфатом аммония. Как показано на фиг.7, сравнивали процент растворимых белков этих производных при различных концентрациях сульфата аммония.

Анти-VEGF-связывающие агенты после инкубирования в течение 30 минут при 50°C		
Название пробы	Бета-складка, %	Нанопадение (мг/мл)
950	100,8	81,2
978	100,9	85,1
980	99,9	100,3
991	99,4	99,2
802	100,4	96,7
821	100,6	93,5
903	99,5	99,4
961	98,7	101,7
997	99,9	76,39

Анти-VEGF-связывающие агенты после инкубирования в течение 30 минут при 60°C		
Название пробы	Бета-складка, %	Нанопадение (мг/мл)
950	45,9	2

	978	102,3	52
	980	100,8	61
	991	99,9	80
	802	101,5	96
5	821	101,9	84
	903	100,5	89
	961	100,1	85
	997	49,1	2
	Таблица 12a		
	Анти-VEGF-связывающие агенты после инкубирования в течение 30 минут при 70°C		
10	Название пробы	Бета-складка, %	Нанопадение (мг/мл)
	950	43,1	1,0
	978	13,4	2,7
	980	4,5	0,2
	991	21,5	1,4
	802	100,4	80,8
15	821	58,4	3,3
	903	81,9	0,7
	961	46,3	1,1
	997	0,0	0,3

#### ПРИМЕР 4

#### АНАЛИЗЫ БЛОКИРОВАНИЯ РЕЦЕПТОРА VEGF

Для кандидатов анти-VEGF-scFv или их производных, описанных в данном изобретении, измеряли также их эффективность в качестве ингибиторов VEGF, наряду с их аффинностью связывания с VEGF в примере 3. Способы измерения их эффективности включают в себя, например, конкурентный ELISA VEGFR, иллюстрируемый в этом примере, и HUVES-анализы (фиг.8).

Конкурентные анализы ELISA VEGFR включают в себя, например, анализы блокирования рецептора VEGFR2 и анализы блокирования VEGFR1. Для анализа блокирования рецептора VEGFR2, VEGF<sub>165</sub> человека наносили в виде покрытия на 96-луночный планшет Maxisorp ELISA (Nunc) при 0,05 мкг/мл в PBS и блокировали с использованием PBS с 0,1% BSA и 0,2% Твином 20 (PBST). 500 нг/мл рекомбинантного химерного антитела VEGFR2 человека/Fc (R&D Systems Inc.), состоящего из аминокислотных остатков 1-764 внеклеточного домена VEGFR2 человека, слитого с меченым 6х гистидинами Fc IgG<sub>1</sub> человека, сначала инкубировали с 3-кратно серийно разведенными анти-VEGF-scFv в PBST. После 30-60 минут инкубирования при комнатной температуре, эти смеси переносили в планшет с иммобилизованным VEGF<sub>165</sub> человека и инкубировали в течение 90 минут. Связывание этой химеры VEGFR2/Fc с иммобилизованным VEGF<sub>165</sub> детектировали козым (Fab<sub>2</sub>) против Fcγ IgG человека, связанным с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch) с последующим добавлением субстрата (BM Blue POD substrate, Roche Diagnostics). Оптическую плотность при 450 нм (OD 450 нм) измеряли при помощи микропланшет-ридера Sunrise (Tecan). Данные анализировали с использованием подгонки четырехпараметрической логистической кривой и величины EC<sub>50</sub> рассчитывали из кривых доза-ответ этих scFv. Примерная эффективность главных кандидатов или их производных, измеренная анализом блокирования рецептора VEGFR2, приведена в списке в таблице 7 и 9.

Для анализа блокирования рецептора VEGFR1, VEGF<sub>165</sub> человека наносили в виде покрытия на 96-луночный планшет Maxisorp ELISA (Nunc) при 0,0125 мкг/мл в PBS и блокировали с использованием PBS с 0,4% BSA и 0,1% Твином 20 (PBST). 100 нг/мл

рекомбинантного химерного антитела VEGFR1 человека/Fc (R&D Systems Inc.), состоящего из аминокислотных остатков 1-687 внеклеточного домена VEGFR1 человека, слитого с меченым 6х гистидинами Fc IgG<sub>1</sub> человека, сначала инкубировали с 3-кратно серийно разведенными анти-VEGF-scFv в PBST. После 30-60 минут инкубирования при комнатной температуре, эти смеси переносили в планшет с иммобилизованным VEGF<sub>165</sub> человека и инкубировали в течение 90 минут. Связывание этой химеры VEGFR1/Fc с иммобилизованным VEGF<sub>165</sub> детектировали козьим (Fab<sub>2</sub>) против Fcγ IgG человека, связанным с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch) с последующим добавлением субстрата (BM Blue POD substrate, Roche Diagnostics). Оптическую плотность при 450 нм (OD 450 нм) измеряли при помощи микропланшет-ридера Sunrise (Tecan). Данные анализировали, как описано выше, и величины EC<sub>50</sub> рассчитывали из кривых доза-ответ этих scFv. Примерная эффективность главных кандидатов, измеренная анализом блокирования рецептора VEGFR1, приведена в списке в таблице 7.

#### ПРИМЕР 5

#### HUVEC-АНАЛИЗ ИНГИБИРОВАНИЯ VEGF

Этот пример иллюстрирует HUVEC-анализы в качестве другого способа измерения эффективности описанных кандидатных анти-VEGF-scFv или их производных в качестве ингибиторов VEGF.

Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) (Promocell), объединенные из нескольких доноров, использовали при пассаже 2 - пассаже 14. Клетки высевали при 1000 клетках на лунку в 50 мкл полной среды для выращивания эндотелиальных клеток (ECGM) (Promocell), которая содержала 0,4% ECGS/H, 2% фетальную телячью сыворотку, 0,1 нг/мл эпидермального фактора роста, 1 мкг/мл гидрокортизона, 1 нг/мл основного фактора фибробластов и 1% пенициллин/стрептомицин (Gibco). Спустя 7-8 часов, добавляли к клеткам 50 мкл истощенной среды (ECGM без добавок, содержащая 0,5% инактивированную нагреванием FCS и 1% пенициллин-стрептомицин), и эти клетки лишали питательной среды в течение 15-16 часов. Готовили 3-кратные серийные разведения анти-VEGF-scFv (0,023-150 нМ) и получали один из следующих VEGF: рекомбинантный VEGF<sub>165</sub> человека (0,08 нМ), рекомбинантный VEGF<sub>165</sub> мыши (0,08 нМ) или рекомбинантный VEGF<sub>165</sub> крысы (0,3 нМ) в истощенной среде и прединкубировали в течение 30-60 мин при комнатной температуре. Различные концентрации VEGF использовали для компенсации в отношении их различных относительных биологических активностей. Использовали концентрации, которые стимулируют субмаксимальную VEGF-индуцированную пролиферацию (EC<sub>90</sub>). 100 мкл этих смесей добавляли в 96-луночные планшеты для культуры ткани, содержащие суспензию HUVEC, и инкубировали в течение 4 дней в увлажненном термостате 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Пролиферацию HUVEC оценивали измерением оптической плотности при 450 нм (в качестве ссылочной длины волны использовали 620 нм) после добавления 20 мкл на лунку реагента пролиферации WST-1 (Roche), с использованием микропланшет-ридера Sunrise (Tecan). Данные анализировали с использованием подгонки четырехпараметрической логистической кривой и концентрацию анти-VEGF-scFv, необходимую для ингибирования пролиферации HUVEC на 50% (EC<sub>50</sub>), получали из кривых ингибирования.

Примерная эффективность главных кандидатов или их производных, измеренная анализами HUVEC, приведена в списке в таблице 7. Кроме того, ингибирование hVEGF<sub>165</sub>-индуцированной пролиферации HUVEC одним производным главных

кандидатов, 578minmax, иллюстрировано на фиг.9. Было определено, что EC50 578minmax для ингибирования hVEGF<sub>165</sub>-индуцированной пролиферации равна 0,06 нМ (фиг.9). Эффективность 578minmax в качестве ингибитора VEGF приблизительно в 1,6 раз лучше в сравнении Lucentis. Ингибирование hVEGF<sub>165</sub>-индуцированной пролиферации HUVEC с использованием 578minmax также иллюстрируется на фиг.10. EC50 578minmax для ингибирования индуцированной VEGF<sub>164</sub> мыши и крысы пролиферации клеток равна 0,06 нМ и 0,07 нМ, соответственно (фиг.10). Таким образом, мышинный и крысиный VEGF являются равнозначными VEGF человека в отношении их ингибирования примерным производным (578minmax). В этом эксперименте Lucentis также не ингибирует пролиферацию, индуцируемую VEGF грызунов.

#### **ПРИМЕР 6**

#### **ДЕЙСТВИЯ анти-VEGF-scFv НА ИНДУЦИРОВАННУЮ hVEGF<sub>165</sub>**

#### **ПРОНИЦАЕМОСТЬ СОСУДОВ В БЕСШЕРСТНЫХ МОРСКИХ СВИНКАХ**

В этом примере, действие анти-VEGF-scFv на индуцированную VEGF<sub>165</sub> человека проницаемость сосудов оценивали на морской свинке с использованием анализа Miles. Тридцать участков нанесения на одно животное отмечали на спине бесшерстных самцов морских свинок с использованием постоянного маркера. В день обработки каждому животному вводили внутривенно 1 мл 1% раствора красителя Evans blue под общей анестезией. Спустя один час после инъекции красителя, инъецировали 0,1 мл тест-раствора, содержащего 2,61 нМ рекомбинантного VEGF<sub>165</sub> человека (PeproTech EC Ltd.), и различные концентрации анти-VEGF-scFv (0 нМ, 0,085 нМ, 0,256 нМ, 0,767 нМ, 2,3 нМ, 6,9 нМ, 20,7 нМ, 62,1 нМ; n=7 животных на тестируемый компонент) в трех повторях в метки на спине (3 инъекции на каждую концентрацию тестируемого компонента). В качестве отрицательного контроля во всех животных служил PBS. В качестве дополнительного контроля, во всех животных инъецировали 6,9 нМ Lucentis (Novartis).

Спустя один час после инъекции тест-раствора, животных эвтаназировали и шкурки собирали, очищали и фотографировали цифровым фотоаппаратом с использованием падающего света и проходящего света. Площадь красителя Evans blue, который просачивался в виде транссудации в участках инъекции, оценивали с использованием ImageJ. Для каждого животного, концентрацию анти-VEGF-scFv в зависимости от площади просачивания анализировали с использованием подгонки 4-параметрической логистической кривой. Концентрацию анти-VEGF-scFv, требующуюся для ингибирования просачивания из сосудов на 50% (EC<sub>50</sub>) получали из кривых ингибирования.

Протокол этого эксперимента иллюстрируется на фиг.11. Кроме того, эффективность кандидатных scFv, ESBA903 (578minmax) и 802 (511max), в ингибировании hVEGF иллюстрировалась на фиг.11, в виде различных размеров площадей, содержащих краситель Evans blue, просачивавшийся из сосудистой системы в кожу. Данные эффективности для 903 и 802 показаны на фиг.12. При 6,9 нМ, 903 и 802 показали более сильное ингибирование индуцированного VEGF просачивания сосудов в кожу в сравнении с Lucentis во всех тестируемых животных (фиг.12).

#### **ПРИМЕР 7**

#### **ДЕЙСТВИЯ МЕСТНОЙ ОБРАБОТКИ анти-VEGF-scFv НА VEGF<sub>165</sub>-ИНДУЦИРОВАННОЕ ПРОСАЧИВАНИЕ СОСУДОВ СЕТЧАТКИ У КРЫС**

В этом примере, локальная эффективность 578minmax демонстрируется с использованием модифицированного анализа Miles. Эти модификации включают в

себя, например, исследования с предварительно смешанными интравитреальными инъекциями и локальным нанесением scFv.

Предварительно смешанные различные концентрации анти-VEGF-scFv (10-, 3- и 1-кратный молярный избыток в сравнении с VEGF) и VEGF (500 нг) наносили посредством единой интравитреальной инъекции. Авастин (Roche) (10-, 3- и 1-кратный молярный избыток в сравнении с VEGF) использовали в качестве положительного контроля. Носитель для 578minmax (цитратный буфер, 20 мМ Na-цитрат, 125 мМ NaCl, pH 7) использовали в качестве отрицательного контроля. Как показано на фиг.13, предварительное смешивание с VEGF<sub>165</sub> облегчало 578minmax (ESBA903) выполнять полное ингибирование hVEGF-индуцированной проницаемости сосудов сетчатки. В этом эксперименте, ингибирующее действие 578minmax (ESBA903) было более существенным в сравнении с Авестином.

Для местного нанесения, за пять дней перед стимуляцией VEGF, взрослые крысы Sprague-Dawley получали 578minmax (1% = 10 мг/мл) через билатеральное местное q.i.d введение (4 капли/день) до дня перфузии (День 6). Носитель для 578minmax (местное введение доз) и Alcon RTKi (10 мг/кг/день, пероральное зондовое введение) использовали в качестве отрицательного и положительного контролей. В день 5, крыс анестезируют и их зрачки расширяют. Все животные получают интравитреальные инъекции 500 нг hrVEGF (10 мкл) в оба глаза. Спустя 24 часа после инъекции VEGF, выполняют внутривенную инфузию красителя Evans blue на всех животных во время общей анестезии. После циркуляции этого красителя в течение 90 минут крыс эвтанализуют. Берут пробы крови, затем крыс перфузируют стерильным солевым раствором, затем оба глаза каждой крысы немедленно энуклеируют и сетчатки собирают с использованием хирургического микроскопа. Как для проб сетчатки, так и для проб плазмы, используют 60 мкл супернатанта для измерения абсорбции красителя Evans blue при помощи спектрофотометра при 620/740 нМ. Разрушение гематоретинального барьера и последующую проницаемость сосудов сетчатки, измеренные по абсорбции красителя, рассчитывают в виде среднего  $\pm$  s.e.m. нетто ABS/сырая масса/плазма ABS. Используют однофакторный ANOVA для определения общего различия между способами обработки, где  $P \leq 0,05$  является значимым. Как иллюстрировано на фиг.14, локальное введение (5 дней предобработки, 4 капли в день) 578minmax (903) значительно ингибировало hVEGF-индуцированную проницаемость сосудов. Это является первой демонстрацией локально эффективного антитела, применимого для лечения внутриглазного заболевания.

### **ЭКВИВАЛЕНТЫ**

Многочисленные модификации и альтернативные варианты по настоящему изобретению будут очевидны специалистам в данной области в связи с предыдущим описанием. Таким образом, это описание должно пониматься только как иллюстративное и предназначено для разъяснения специалистам в данной области наилучшего способа проведения по настоящему изобретению. Детали этой структуры могут варьироваться по существу без отклонения от идеи по настоящему изобретению, и резервируется эксклюзивное применение всех модификаций, которые находятся в объеме прилагаемой формулы изобретения. Предполагается, что данное изобретение ограничивается только до степени, требуемой прилагаемой формулой изобретения и применимыми нормами права.

Весь литературный и подобный материал, цитируемый в этой заявке, включающий в себя патенты, заявки на патент, статьи, книги, учебники, диссертации, веб-страницы, фигуры и/или приложения, независимо от формата таких литературных и подобных

материалов, особо включены в качестве ссылки в их полном объеме. В случае, когда один или несколько из этих включенных литературных и подобных материалов отличается от этого описания или противоречит этому описанию, в том числе определенным терминам, применению терминов, описанным способам или т.п.,  
5 контролем является это описание.

Заголовки разделов, используемые в данном случае, предназначены только для организационных целей и не должны пониматься как ограничивающие каким-либо образом описанный предмет изобретения.

Хотя настоящее изобретение было описано вместе с различными вариантами и  
10 примерами, не предполагается, что данные описания ограничены такими вариантами или примерами. Напротив, данные изобретения включают в себя различные альтернативы, модификации и эквиваленты, как будет понятно специалистам в данной области.

Данная формула изобретения не должна пониматься как ограничивающая порядок  
15 или элементы изобретения, если это не указано. Должно быть понятно, что могут быть произведены различные изменения в форме или деталях без отклонения от объема прилагаемой формулы изобретения. Таким образом, заявляются все варианты, которые находятся в пределах объема и идеи следующей формулы изобретения, и их эквиваленты.

### **СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

20 SEQ ID NO:1

Пептидный иммуноген

KFMDVYQRSYC

**VL-последовательности:**

SEQ ID NO. 72: 60

25 EVVMAQTPASVEAAVGGTVTIKCQASQSISYLSWYQQKPGQPPKLLIYKASTLASG  
VPSRFKGSRS GTEYTLTISDLECADAAATYYCQSNYGGSSSDYGNPFGGGTEAVVK

SEQ ID NO. 73: 435

AFELTQTPSSVEAAVGGTVTIKCQASQSIGSSLAWYQQKPGQRPKLLIYTAANLASGV  
PSRFRGSRSG AAFTLTISDLECADAAATYYCQNFATS DTVTFGGGTEVVVT

30 SEQ ID NO. 74: 453

AVVLTQTPSPVSAAVGGTVSISCSQSSQSVWNNRLAWFQQKSGQPPKLLIYYASTLA  
SGVPSRFKG SSGTEFTLTISDVQCDDAAATYYCAGGYSSTSDNTFGGGTEVVVK

SEQ ID NO. 75: 375

35 DIVMTQTPASVEATVGGTITINCQASENINIWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASKLASGV  
PSRFKGS GSGTQFTLTISDLECADAAATYYCQNNYSYNRYGAPFGGGTEVVVK

SEQ ID NO. 76: 610

DVVMTQTPASVSEPVGGTVTIKCQASQSISWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASTLASG  
VPPRSSGSGSGTEYTLTISDLECADAAATYFCQNNYGFERSYGGAFGGGTEVVVK

SEQ ID NO.77: 578

40 DVVMTQTPSSVSAAVGDTVTINCQASEIIHSLAWYQQKPGQPPKLLIYLASTLASG  
VPSRFKGS GSGTQFTLTISDLECADAAIYYCQNVYLASTNGANFGGGTEVVVK

SEQ ID NO. 78: 534

DVVMTQTPSSVSAAVGDTVTIKCQASQSINIWLSWYQQKSGQPPKLLIYKESTLASG  
VPSRFRGSGSGTQFTLTISDLECADAAATYYCQNNYDSGNNGFPPGGGTEVVVK

45 SEQ ID NO. 79: 567

DVVMTQTPSSVSAAVGDTVTINCQADQSIYIWLSWYQQKPGQPPKLLIYKASTLESG  
VPSRFKGS GSGTQFTLTISDLECADAAATYYCQNNAHYSTNGGTFGGGTEVVVK

SEQ ID NO. 80: 509

DVVMTQTPSSVSAVGDVTIKCQASQNIRIWLWSWYQQKPGQPPKLLIYKASTLESG  
VPSRFKSGSGTEFTLTISDLECADAAATYYCQNNAHYSTNGGTFGGGTEVVVK

SEQ ID NO. 81: 511

EVVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQASQSINIWCSWYQQKPGHPPKLLIYRASTLASG  
5 VSSRFKSGSGTEFTLTISDLECADAAATYYCQANYA YSAGYGAAFGGGTEVVVK

SEQ ID NO. 82: 60min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSISYLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVP  
SRFSGSGSGA EFTLTISLQPDDFATYYCQSNYGGSSSDYGNPFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 83: 435min

10 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIGSSLAWYQQKPGKAPKLLIYTAANLASGV  
PSRFSGSGSG AEFTLTISLQPDDFATYYCQNFATS DTVTFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 84: 453min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSSQSVWNNRLAWYQQKPGKAPKLLIYYASTLA  
SGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCAGGYSSTSDNTFGQGTKLTVLG

15 SEQ ID NO. 85: 375min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASENINIWLWSWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGV  
PSRFSGSGSG AEFTLTISLQPDDFATYYCQNNYSYNYRYGAPFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 86: 610min

20 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSISWLSWYQQKPGKAPKLLIYQASTLASGVP  
SRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQNNYGFERSYGGAFGGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 87: 578min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVP  
SRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 88: 534min

25 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSINIWLWSWYQQKPGKAPKLLIYKESTLASGVP  
SRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQNNYDSGNGFPFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 89: 567min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQADQSIYIWLWSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVP  
SRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQNNAHYSTNGGTFGGQGTKLTVLG

30 SEQ ID NO. 90: 509min

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQNIRIWLWSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVP  
SRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQNNAHYSTNGGTFGGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 91: 511min

35 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSINIWCSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVP  
SRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQANYAYSAGYGAAFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 92: 578min\_Pref subst

EIVLTQSPSSLASVGDRVTITCQASEIIHSWLAWYQQRPGKAPKLLISLASTLASGVP  
SRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDFAVYYCQNVYLASTNGANFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO. 93: 60max

40 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSISYLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVP  
SRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQSNYGGSSSDYGNPFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 94: 435max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIGSSLAWYQQKPGKAPKLLIYTAANLASGV  
PSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQNFATS DTVTFGQGTKLTVLG

45 SEQ ID NO. 95: 453max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQSSQSVWNNRLAWYQQKPGKAPKLLIYYASTLA  
SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCAGGYSSTSDNTFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 96: 375max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASENINIWLSWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGV  
PSRFSGSGSGTQFTLTISLQPDDEFATYYCQNNYSYNNRYGAPFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 97: 610max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLIYQASTLASGVP  
5 SRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQNNYGFRSYGGAFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 98: 578max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVP  
SRFSGSGSGTQFTLTISLQPDDEFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 99: 534max

10 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSINIWLSWYQQKPGKAPKLLIYKESTLASGVP  
SRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQNNYDSGNNGFPGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 100: 567max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQADQSIYIWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVP  
SRFSGSGSGT QFTLTISLQPDDEFATYYCQNNAHYSTNGGTFGQGTKLTVLG

15 SEQ ID NO. 101: 509max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQNIRIWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVP  
SRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQNNAHYSTNGGTFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 102: 511max

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSINIWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVP  
20 SRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQANYAYSAGYGAAFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 103: 578max\_Pref subst

EIVMTQSPSSLASVGDRVTITCQASEIIHSWLAWYQQRPGKAPKLLISLASTLASGVP  
SRFSGSGSGTQFTFTISLQPEDFAVYYCQNVYLASTNGANFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO. 104: 578min VL: E1D

25 DIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVP  
SRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLG

SEQ ID NO. 105: 578min VL: 12V

EVVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGV  
PSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLG

30 SEQ ID NO. 106: 511min VL: C41L

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSINIWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVP  
SRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQANYAYSAGYGAAFGQGTKLTVLG

**VH-последовательности:**

SEQ ID NO. 107: 60-11-4

35 QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSSGYWVCWVRQAPGKGLEWIACIYAGSSG  
STYYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARGNNYYIYTDGGYAYAGL  
ELWGPILTVSS

SEQ ID NO. 108: 60-11-6

40 QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSSGYWICWVRQAPGKGLEWIACIYAGSSG  
STYYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARGNNYYIYTDGGYAYAGL  
ELWGPILTVSS

SEQ ID NO. 109: 435

45 QSLEESGGDLVQPGASLTLTCKVSGFSLNTNYWMCWVRQAPGKGLEWIGCMYTGS  
YNRAYYASWAKGRFTSSKTSSTTVTLEMTSLTAADTATYFCAKGSNWYSDLWGPGL  
VTVSS

SEQ ID NO. 110: 453

QERLVESGGGLVQPEGSLTLTCKASGFSSRSYYIYWVRQAPGKGLEWIACIDAGSSG  
ILVYANWAK GRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARGDASYGVDSFMLPLWGP

GTLVTVSS

SEQ ID NO. 111: 375

QSLEESGGGLVQPEGSLTLTCKASGFSFTTTDYMCWVRQAPGKGLEWIGCILAGDGS  
 TYYANWAKGRFTGSKTSSTTVDLKMTGLTAADTATYFCARSDPASSWSFALWGPGLT  
 5 VTVSS

SEQ ID NO. 112: 610

QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGIDFSGAYYMGWVRQAPGKGLEWIGYIDYDGDR  
 YYASWAKGRFTISKTSSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARSDYSSGWGTDIWGPGTLVTVSL

SEQ ID NO. 113: 578

10 QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLTDYYYMTWVRLAPGKGLEYIGFIDPDDDDP  
 YYATWAKGRFTISRTSTTVNLKMTSPTTEDTATYFCAGGDHNSGWGLDIWGPGTLVTV  
 SL

SEQ ID NO. 114: 534

15 QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLSYYYMSWVRQAPGKGLEWIGIIGPGDYTDY  
 ASWAKGRFTISKTSSTTVDLKITSPTTEDTATYFCGRGDDNSGWGEDIWGPGLVTVSL

SEQ ID NO. 115: 567

QSVEESGGRLVTPGAPLTLTCSVSGFSLSDYYMCWVRQAPGKGLQWIGCLDYFGST  
 DDASWAKGRFTISKTSSTAVDLKITSPTTEDTATYFCARTDDSRGWGLNIWGPGTLVTV  
 SL

20 SEQ ID NO. 116: 509

QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLSYYMCWVRQAPGKGLEWIGCLDYVGDTD  
 YASWAKGRFTISKASTTVDLKITSLTEDTATYFCARTDDSRGWGLNIWGPGTLVTVSL

SEQ ID NO. 117: 511

25 QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLNTYYMNWVRQAPGKGLEWIGIIPDDTTY  
 YASWAKSRSTITRDTNENTVTLKMTSLTTEDTATYFCARSGDTTAWGADIWGPGTLVT  
 VSL

SEQ ID NO. 118: 60-11-4min

30 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSSGYWVCWVRQAPGKGLEWVSCIYAGS  
 SGSTYYASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGNNYYIYTDGGYA  
 YAGLELWGQGLVTVSS

SEQ ID NO. 119: 60-11-6min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSGYWICWVRQAPGKGLEWVSCIYAGSS  
 GSTYYASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGNNYYIYTDGGYAY  
 AGLELWGQGLVTVSS

35 SEQ ID NO. 120: 435min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNTNYWMCWVRQAPGKGLEWVSCMYT  
 GSYNRAYYASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSNWYSDLWG  
 QGLVTVSS

SEQ ID NO. 121: 453min

40 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSRSYYIYWVRQAPGKGLEWVSCIDAGSS  
 GILVYANWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGDASYGVDSFMLPL  
 WGQGLVTVSS

SEQ ID NO. 122: 375min

45 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFTTTDYMCWVRQAPGKGLEWVSCILAGD  
 GSTYYANWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSDPASSWSFALWGQ  
 GTLVTVSS

SEQ ID NO. 123: 610min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSGAYYMGWVRQAPGKGLEWVSYIDYD

GDRYYASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSDYSSGWGTDIWGQ  
GTLVTVSS

SEQ ID NO. 124: 578min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSLTDY YMTWVRQAPGKGLEWVSFIDPDD  
5 DPYYATWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGDHNSGWGLDIWGQ  
GTLVTVSS

SEQ ID NO. 125: 534min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSLSY YMSWVRQAPGKGLEWVSIIGPGDY  
10 TDYASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGDDNSGWGEDIWGQG  
TLVTVSS

SEQ ID NO. 126: 567min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSLSDY YMCWVRQAPGKGLEWVSCLDYFG  
STDDASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKTDDSRGWGLNIWGQG  
TLVTVSS

15 SEQ ID NO. 127: 509min

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSLSSY YMCWVRQAPGKGLEWVSCLDYVG  
DTDYASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKTDDSRGWGLNIWGQG  
TLVTVSS

SEQ ID NO. 128: 511min

20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSLNTY YMNWVRQAPGKGLEWVSIIAPDDT  
TYYASWAKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGD TTAWGADIWGQGT  
LTVTVSS

SEQ ID NO. 129: 578min\_Pref subst

substQVQLVQTGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSLTDY YMTWVRQAPGKGLEWVSFI  
25 DPDDDPYYATWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTALYYCAKGDHNSGWGLDI  
WGQGT LTVTVSS

SEQ ID NO. 130: 60-11-4max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CTASGF PFSSGYWVCWVRQAPGKGLEWVGCIYAGS  
SGSTYYASWAKGRFTISK DTSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARGNNYYIYTDGGYA  
30 YAGLELWGQGT LTVTVSS

SEQ ID NO. 131: 60-11-6max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CTASGF SFSSGYWICWVRQAPGKGLEWVGCIYAGS  
SGSTYYASWAKGRFTISK DTSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARGNNYYIYTDGGYA  
YAGLELWGQGT LTVTVSS

35 SEQ ID NO. 132: 435max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CKVSGFSLNT NYWMCWVRQAPGKGLEWVGCMYT  
GSYNRAYYASWAKGRFTSS KDTSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGSNWYSDLWG  
QGT LTVTVSS

SEQ ID NO. 133: 453max

40 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CKASGF SFSRSYYIYWVRQAPGKGLEWVG CIDAGSS  
GILVYANWAKGRFTISK DTSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARGDASYGVDSFMLPL  
WGQGT LTVTVSS

SEQ ID NO. 134: 375max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CKASGF SFTTTDYMCWVRQAPGKGLEWVGCILAGD  
45 GSTYYANWAKGRFTGSK DTSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARSDPASSWSFALWG  
QGT LTVTVSS

SEQ ID NO. 135: 610max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CTASGIDFSGAY YMGWVRQAPGKGLEWVGYIDYD

GDRYYASWAKGRFTISKDTSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARSDYSSGWGTDIWGQ  
GTLVTVSS

SEQ ID NO. 136: 578max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDY Y Y MTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD  
5 DPYYATWAKGRFTISRDT SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
GTLVTVSS

SEQ ID NO. 137: 534max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSY Y Y MSWVRQAPGKGLEWVGIIIPGDY  
TDYASWAKGRFTISKDTSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARGDDNSGWGEDIWGQG  
10 TLVTVSS

SEQ ID NO. 138: 567max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSVSGFSLSDY Y MCWVRQAPGKGLEWVGCLDYFG  
STDDASWAKGRFTISKDTSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARTDDSRGWGLNIWGQG  
TLVTVSS

15 SEQ ID NO. 139: 509max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSY Y MCWVRQAPGKGLEWVGCLDYVG  
DTDYASWAKGRFTISKDASKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARTDDSRGWGLNIWGQ  
GTLVTVSS

SEQ ID NO. 140: 509maxII

20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSY Y MSWVRQAPGKGLEWVGILDYVGD  
TDYASWAKGRFTISKDASKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARTDDSRGWGLNIWGQG  
TLVTVSS

SEQ ID NO. 141: 511max

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLNTY Y MNWVRQAPGKGLEWVGIIAPDDT  
25 TYYASWAKSRSTISRDT SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARSGDTTAWGADIWGQGT  
LTVVSS

SEQ ID NO. 142: 578max\_Pref subst

substQVQLVQTGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDY Y Y MTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD  
DPDDDPYYATWAKGRFTISRDT SKNTVY LQMNSLRAEDTALYYCAGGDHNSGWGLDI  
30 WQQGTLVTVSS

SEQ ID NO. 143: 567minDHP

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFSLSDY Y MCWVRQAPGKGLEWVSCLDYFG  
STDDASWAKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTATYYCAKTDDSRGWGLNIWGQG  
TTVTVSS

35 SEQ ID NO. 144: 578maxDHP

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSLTDY Y Y MTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD  
DPYYATWAKGRFTISRDT SKNTVY LQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
GTTVTVSS

SEQ ID NO. 145: 511maxDHP

40 EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTVSGFSLNTY Y MNWVRQAPGKGLEWVGIIAPDDT  
TYYASWAKSRSTISRDT SKNTVY LQMNSLRAEDTATYYCARSGDTTAWGADIWGQGT  
TVTVSS

SEQ ID NO. 146: 578max\_Pref subst\_DHP

QVQLVQTGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSLTDY Y Y MTWVRQAPGKGLEWVGFIDPD  
45 DDPYYATWAKGRFTISRDT SKNTVY LQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWG  
QGTTVTVSS

SEQ ID NO. 147: 578max VH: El\_

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDY Y Y MTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD

PYYATWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
TLVTVSS

SEQ ID NO. 148: 578max VH: V2Q

EQQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD  
5 DPYYATWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
GTLVTVSS

SEQ ID NO. 149: 578max VH: Q46L

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRLAPGKGLEWVGFIDPDD  
10 DPYYATWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
GTLVTVSS

SEQ ID NO. 150: 578max VH: W54Y

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD  
DPYYATWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
GTLVTVSS

15 SEQ ID NO. 151: 578max VH: V55I

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWIGFIDPDD  
DPYYATWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
GTLVTVSS

SEQ ID NO. 152: 578max VH: D83A

20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD  
DPYYATWAKGRFTISRATSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
GTLVTVSS

SEQ ID NO. 153: 578max VH: N87A

25 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD  
DPYYATWAKGRFTISRDTSKATVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
GTLVTVSS

SEQ ID NO. 154: 578max VH: Y105F

30 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD  
DPYYATWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
TLVTVSS

SEQ ID NO. 155: 578max VH: D83\_

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD  
DPYYATWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
TLVTVSS

35 SEQ ID NO. 156: 578max VH: N87\_

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD  
DPYYATWAKGRFTISRDTSKTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
TLVTVSS

SEQ ID NO. 157: 578max VH: T84N

40 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD  
DPYYATWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
GTLVTVSS

SEQ ID NO. 158: 578max VH: V89L

45 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD  
DPYYATWAKGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
GTLVTVSS

SEQ ID NO. 159: 578max VH: V89A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD

DPYYATWAKGRFTISRDTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
GTLVTVSS

SEQ ID NO. 160: 578maxDHP VH: T84N

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD

5 DPYYATWAKGRFTISRDNKNTVYLYQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
GTTVTVSS

SEQ ID NO. 161: 578maxDHP VH: V89L

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD

10 DPYYATWAKGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
TTVTVSS

SEQ ID NO. 162: 578maxDHP VH: V89A

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD

DPYYATWAKGRFTISRDTSKNTAYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
GTTVTVSS

15 SEQ ID NO. 163: 578max VH:T84N, V89A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD

DPYYATWAKGRFTISRDNKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
GTLVTVSS

SEQ ID NO. 164: 578max VH:T84N, V89L

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD

20 DPYYATWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
GTLVTVSS

SEQ ID NO. 165: 578maxDHP VH: T84N, V89A

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD

25 DPYYATWAKGRFTISRDNKNTAYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
GTTVTVSS

SEQ ID NO. 166: 578maxDHP VH: T84N, V89L

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDD

30 DPYYATWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAGGDHNSGWGLDIWGQ  
GTTVTVSS

Каркасные последовательности (X остатки являются сайтами инсертирования CDR и могут быть любой природно-встречающейся аминокислотой. Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот):

SEQ ID NO. 167: Вариабельные легкие цепи FW1.4 и rFW1.4

35 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)<sub>n=3-50</sub> WYQQKPGKAPKLLIY(X)<sub>n=3-50</sub>

GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYC(X)<sub>n=3-50</sub> FGQGTKLT VLG

SEQ ID NO. 168: rFW1.4 вариант 2 (v2)

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC(X)<sub>n=3-50</sub> WYQQKPG KAPKLLIY(X)<sub>n=3-50</sub>

40 GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYC(X)<sub>n=3-50</sub> FGQGTKLT VLG

SEQ ID NO. 169: Вариабельная тяжелая цепь FW1.4

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(X)<sub>n=3-50</sub> WVRQAPGKGLEWVS (X)<sub>n=3-50</sub> RFTIS

RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAK(X)<sub>n=3-50</sub> WGQGTL VTVSS

SEQ ID NO. 170: Вариабельная тяжелая цепь rFW1.4

45 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS(X)<sub>n=3-50</sub> WVRQAPGKGLEWVG(X)<sub>n=3-50</sub> RFTIS

RDTSKNTVYLYQMNSLRAEDTA VYYCAR(X)<sub>n=3-50</sub> WGQGLV TVS

SEQ ID NO. 171: Вариабельная тяжелая цепь rFW1.4 вариант 2 (v2)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS(X)<sub>n=3-50</sub> WVRQAPGKGL LEWVG(X)<sub>n=3-50</sub>  
RFTISKDTSKNTVYVYLQMNLSRAEDTAVYYCAR(X)<sub>n=3-50</sub> WGQGTLVTVSS

Каркасные последовательности ScFv:

SEQ ID NO. 172: FW1.4

5 EIVMTQSPSTLSASVGDRIITC(X)<sub>n=3-50</sub> WYQQKPGKAPKLLIY(X)<sub>n=3-50</sub>

GVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYC(X)<sub>n=3-50</sub>

FGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS

(X)<sub>n=3-50</sub> WVRQAPGKGLEWVS(X)<sub>n=3-50</sub> RFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTA VYYCAK

10 (X)<sub>n=3-50</sub> WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO. 173: rFW1.4

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITC(X)<sub>n=3-50</sub> WYQQKPGKAPKLLIY(X)<sub>n=3-50</sub>

GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYC(X)<sub>n=3-50</sub>

15 FGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS

(X)<sub>n=3-50</sub> WVRQAPGKGLEWVG(X)<sub>n=3-50</sub> RFTISRDT SKNTVYVYLQMNLSRAEDTA VYYCAR

(X)<sub>n=3-50</sub> WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO. 174: rFW1.4 вариант 2 (v2)

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITC(X)<sub>n=3-50</sub> WYQQKPGKAPKLLIY(X)<sub>n=3-50</sub>

20 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYC(X)<sub>n=3-50</sub> FGQGTKLTVLGGGGGSGGGG

GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVS(X)<sub>n=3-50</sub> WVRQAPGKGLEWVG

(X)<sub>n=3-50</sub> RFTISKDTSKNTVYVYLQMNLSRAEDTA VYYCAR(X)<sub>n=3-50</sub> WGQGTLVTVSS

Последовательности анти-VEGF-scFv:

25 SEQ ID NO. 175: 435\_max

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASQSIGSSLAWYQQKPGKAPKLLIYTAANLASGV

PSRFSGSRSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNFATSDTVTFGQGTKLTVLGGGGGSGGGG

SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGFSLNTNYWMCWVRQAPGKGL

EWVGCMTGSYNRAYYASWAKGRFTSSKDT SKNTVYVYLQMNLSRAEDTAVYYCAKGS

30 NWYSDLWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO. 176: 511\_max

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASQSINIWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVP

SRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQANYAYSAGYGAAFGQGTKLTVLGGGGGSGG

GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLNTYYMNWVRQAPGK

35 GLEWVGIIAPDDTTYASWAKSRSTISRDT SKISITVYVYLQMNLSRAEDTAVYYCARSGD

TTAWGADIWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO. 177: 567\_min

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQADQSIYIWLWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESVP

SRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNNAHYSTNGGTFGQGTKLTVLGGGGGSGG

40 GGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSDY YMCWVRQAPGKGL

LEWVSCLDYFGSTDDASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKTDDS

RGWGLNIWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO. 178: 578min

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASEIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVP

45 SRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLGGGGGSGG

GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTDY YMTWVRQAPGK

GLEWVSFIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKGDH

NSGWGLDIWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO. 179: 578max

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASEIIHSLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVP  
 SRFSGSGSGTQFTLTISLQPDFFATYYCQNVYLASTNGANFGQGKLTIVLGGGGGSGG  
 GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCTASGFSLTDYYMTWVRQAPGK  
 5 GLEWVGFIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAGGDH  
 NSGWGLDIWGQGLVTVSS

SEQ ID NO. 180: 578minmax (ESBA903)

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASEIIHSLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVP  
 SRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNVYLASTNGANFGQGKLTIVLGGGGGSGG  
 10 GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCTASGFSLTDYYMTWVRQAPGK  
 GLEWVGFIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAGGDH  
 NSGWGLDIWGQGLVTVSS

SEQ ID NO. 181 линкер

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

15

### Формула изобретения

1. Рекомбинантное антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), которое нейтрализует VEGF человека и где:

20 а. VH содержит набор CDR последовательностей SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:28, и где VL содержит набор CDR последовательностей SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:51 и SEQ ID NO:62;

б. VH содержит набор CDR последовательностей SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18 и SEQ ID NO:30, и где VL содержит набор CDR последовательностей SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:53 и SEQ ID NO:64;

25 в. VH содержит набор CDR последовательностей SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:31, и где VL содержит набор CDR последовательностей SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:54 и SEQ ID NO:65;

д. VH содержит набор CDR последовательностей SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:32, и где VL содержит набор CDR последовательностей SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:55 и SEQ ID NO:66;

30 е. VH содержит набор CDR последовательностей SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:33, и где VL содержит набор CDR последовательностей SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:67;

35 ф. VH содержит набор CDR последовательностей SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:22 и SEQ ID NO:34, и где VL содержит набор CDR последовательностей SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:57 и SEQ ID NO:68;

40 г. VH содержит CDR (i) SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:35; (ii) SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:35; (iii) SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:35; или (iv) SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:35; и VL содержит CDR SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:69; или

45 h. VH содержит CDR SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:24 и SEQ ID NO:36, и где VL содержит (i) CDR SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:59 и SEQ ID NO:70; или (ii) CDR SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:59 и SEQ ID NO:70.

2. Антитело по п.1, которое является химерным антителом.

3. Антитело по п.1, которое является гуманизированным.

4. Антитело по п.1, содержащее каркасную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO:169.

5. Антитело по п.4, где каркасная область переменного района тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO:170 или SEQ ID NO:171.

6. Антитело по п.1, имеющее делеции в положениях 1, 83 или 87 переменного области тяжелой цепи согласно системе нумерации АНо.

5 7. Антитело по п.1, имеющее замену по меньшей мере в одном из положений 2, 12, 24, 25, 46, 54, 55, 83, 84, 87, 89, 103, 105, 108 или 144 в переменного области тяжелой цепи согласно системе нумерации АНо.

8. Антитело по п.7, где указанные замены выбраны из группы, состоящей из:

- 10 (a) глутамин в положении 2;
- (b) серин в положении 12;
- (c) треонин в положении 24;
- (d) валин в положении 25;
- (e) лейцин в положении 46;
- (f) тирозин в положении 54;
- 15 (g) изолейцин в положении 55;
- (h) аланин в положении 83;
- (i) аспарагин в положении 84;
- (j) аланин или лейцин в положении 87;
- (k) аланин или лейцин в положении 89;
- 20 (l) серин или треонин в положении 103;
- (m) фенилаланин в положении 105;
- (n) аргинин в положении 108; и
- (o) серин или треонин в положении 144.

9. Антитело по п.1, содержащее последовательность каркасной области переменного области легкой цепи, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности SEQ ID NO:167.

10. Антитело по п.9, где каркасная область переменного области легкой цепи представляет собой SEQ ID NO:167 или SEQ ID NO:168.

30 11. Антитело по п.1, имеющее замену по меньшей мере в одном из положений 1, 2 или 15 переменного области легкой цепи согласно системе нумерации АНо.

12. Антитело по п.11, где указанные замены выбраны из группы, состоящей из:

- (a) аспарат в положении 1;
- (b) валин в положении 2; и
- (c) треонин в положении 15.

35 13. Антитело по п.1, содержащее:

а. переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:107, и переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:72;

40 б. переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:109, и переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:73;

45 в. переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:110, и переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:74;

д. переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:111, и вариабельную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:75;

5 е. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:112, и вариабельную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:76;

10 f. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:113, и вариабельную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:77;

15 g. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:114, и вариабельную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:78;

h. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:115, и вариабельную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:79;

20 i. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:116, и вариабельную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:80;

25 j. вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:117, и вариабельную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% аналогична SEQ ID NO:81.

14. Антитело по п.1, которое по меньшей мере на 80% идентично SEQ ID NO:176, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:178, SEQ ID NO:179 или SEQ ID NO:180.

30 15. Фармацевтическая композиция для лечения VEGF- опосредованного заболевания, содержащая терапевтически эффективное количество антитела по любому из пп.1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

16. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело по любому из пп.1-14.

35 17. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.16.

18. Клетка-хозяин для экспрессии антитела, содержащая вектор экспрессии по п.17.

40 19. Способ лечения VEGF-опосредованного заболевания у индивидуума, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп.1-14, таким образом, обеспечивая лечение VEGF-опосредованного заболевания у индивидуума.

20. Способ по п.19, где VEGF-опосредованное заболевание выбрано из группы, состоящей из возрастной дегенерации желтого пятна, неоваскулярной глаукомы, диабетической ретинопатии, ретинопатии недоношенных, ретролентальной фиброплазии, карцином молочной железы, карцином легких, желудочных карцином, эзофагеальных карцином, колоректальных карцином, карцином печени, карцином яичника, комы, арренобластом, карцином шейки матки, эндометриальной карциномы, эндометриальной гиперплазии, эндометриоза, фибросарком, хориокарциномы, рака головы и шеи, назофарингеальной карциномы, карцином гортани, гепатобластомы,

саркомы Капоши, меланомы, кожных карцином, гемангиомы, кавернозной гемангиомы, гемангиобластомы, карцином поджелудочной железы, ретинобластомы, астроцитомы, глиобластомы, Шванномы, олигодендроглиомы, медуллобластомы, нейробластом, рабдомиосаркомы, остеогенной саркомы, лейомиосарком, карцином мочеполовых путей, карцином щитовидной железы, опухоли Вильмса, почечно-клеточной карциномы, рака предстательной железы, патологической пролиферации сосудов, связанной с факотомозом, отеки (например, связанной с опухолями головного мозга), синдрома Мейжа, ревматоидного артрита, псориаза и атеросклероза.

21. Композиция по п.15 для местного, внутриглазного, перорального, назального, ректального или парентерального введения.

22. Способ лечения VEGF-опосредованного заболевания у млекопитающего, в частности, человека, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела по п.15 в фармацевтически приемлемой лекарственной форме местным, внутриглазным, внутримышечным, внутрибрюшинным, интрацеребральным, подкожным, внутриартериальным, интрасиновиальным, интратекальным, пероральным или ингаляционным путем.

23. Антитело по любому из пп.1-14, которое является иммуноглобулином или его фрагментом.

24. Антитело по п.23, где фрагмент иммуноглобулина представляет собой scFv, Fab, фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области, или фрагмент Fv.

25

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ESBATEch AG  
 <120> Стабильные и растворимые антитела, ингибирующие VEGF  
 <130> VEGF binders  
 <140> Us61/133,212  
 <141> 2008-06-25  
 <160> 180  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys  
 1 5 10

<210> 2  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 2

Gly Phe Pro Phe Ser Ser Gly Tyr Trp Val Cys  
 1 5 10

<210> 3  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 3

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Trp Ile Cys  
 1 5 10

<210> 4  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 4

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Gly Phe Ser Leu Asn Thr Asn Tyr Trp Met Cys  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 5

Gly Phe Ser Phe Ser Arg Ser Tyr Tyr Ile Tyr  
 1 5 10

<210> 6  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 6

Gly Phe Ser Phe Thr Thr Thr Asp Tyr Met Cys  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 7

Gly Ile Asp Phe Ser Gly Ala Tyr Tyr Met Gly  
 1 5 10

<210> 8  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 8

Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Tyr Met Thr  
 1 5 10

<210> 9  
 <211> 10  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 9

Gly Phe Ser Leu Ser Tyr Tyr Tyr Met Ser  
 1 5 10

<210> 10  
 <211> 10  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 10

Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Tyr Met Cys  
 1 5 10

<210> 11  
 <211> 10  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 11

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Tyr Met Cys  
 1 5 10

<210> 12  
 <211> 10  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 12

Gly Phe Ser Leu Asn Thr Tyr Tyr Met Asn  
 1 5 10

<210> 13  
 <211> 10  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 13

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Tyr Met Ser  
 1 5 10

<210> 14  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 14

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Gly Tyr Tyr Met Cys  
 1 5 10

<210> 15  
 <211> 18  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 15

Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala  
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 16  
 <211> 18  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 16

Cys Met Tyr Thr Gly Ser Tyr Asn Arg Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala  
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 17  
 <211> 18  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 17

Cys Ile Asp Ala Gly Ser Ser Gly Ile Leu Val Tyr Ala Asn Trp Ala  
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 18  
 <211> 17  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела  
 <400> 18

Cys Ile Leu Ala Gly Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 19  
 <211> 16  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела  
 <400> 19

Tyr Ile Asp Tyr Asp Gly Asp Arg Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly  
 1 5 10 15

<210> 20  
 <211> 16  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела  
 <400> 20

Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly  
 1 5 10 15

<210> 21  
 <211> 16  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела  
 <400> 21

Ile Ile Gly Pro Gly Asp Tyr Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly  
 1 5 10 15

<210> 22  
 <211> 16  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 22

Cys Leu Asp Tyr Phe Gly Ser Thr Asp Asp Ala Ser Trp Ala Lys Gly  
 1 5 10 15

<210> 23  
 <211> 16  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<400> 23

Cys Leu Asp Tyr Val Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly  
 1 5 10 15

<210> 24  
 <211> 16  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 24

Ile Ile Ala Pro Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser  
 1 5 10 15

<210> 25  
 <211> 16  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 25

Ile Leu Asp Tyr Val Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly  
 1 5 10 15

<210> 26  
 <211> 18  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 26

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Cys Ile Asp Ala Gly Ser Asp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala  
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 27  
<211> 19  
<212> Белок  
<213> Неизвестный

<220>  
<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 27

Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr Ala Tyr Ala Gly  
1 5 10 15

Leu Glu Leu

<210> 28  
<211> 8  
<212> Белок  
<213> Неизвестный

<220>  
<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 28

Gly Ser Asn Trp Tyr Ser Asp Leu  
1 5

<210> 29  
<211> 14  
<212> Белок  
<213> Неизвестный

<220>  
<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 29

Gly Asp Ala Ser Tyr Gly Val Asp Ser Phe Met Leu Pro Leu  
1 5 10

<210> 30  
<211> 11  
<212> Белок  
<213> Неизвестный

<220>  
<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 30

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Ser Asp Pro Ala Ser Ser Trp Ser Phe Ala Leu  
1 5 10

<210> 31  
<211> 11  
<212> Белок  
<213> Неизвестный

<220>  
<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 31

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

<210> 32  
<211> 11  
<212> Белок  
<213> Неизвестный

<220>  
<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 32

Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile  
1 5 10

<210> 33  
<211> 11  
<212> Белок  
<213> Неизвестный

<220>  
<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 33

Gly Asp Asp Asn Ser Gly Trp Gly Glu Asp Ile  
1 5 10

<210> 34  
<211> 11  
<212> Белок  
<213> Неизвестный

<220>  
<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 34

Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile  
1 5 10

<210> 35  
<211> 11  
<212> Белок

<213> Неизвестный

<220>

<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 35

Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile  
1 5 10

<210> 36

<211> 11

<212> Белок

<213> Неизвестный

<220>

<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 36

Ser Gly Asp Thr Thr Ala Trp Gly Ala Asp Ile  
1 5 10

<210> 37

<211> 19

<212> Белок

<213> Неизвестный

<220>

<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 37

Gly Asp Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr Ala Tyr Trp Gly  
1 5 10 15

Leu Asp Ile

<210> 38

<211> 11

<212> Белок

<213> Неизвестный

<220>

<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 38

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ser  
1 5 10

<210> 39

<211> 11

<212> Белок

<213> Неизвестный

<220>

<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 39

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu Ala  
 1 5 10

<210> 40  
 <211> 13  
 <212> Белок  
 <213> .Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 40

Gln Ser Ser Gln Ser Val Trp Asn Asn Asn Arg Leu Ala  
 1 5 10

<210> 41  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 41

Gln Ala Ser Glu Asn Ile Asn Ile Trp Leu Ser  
 1 5 10

<210> 42  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 42

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ser  
 1 5 10

<210> 43  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 43

Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp Leu Ala  
 1 5 10

<210> 44

<211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 44

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp Leu Ser  
 1 5 10

<210> 45  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 45

Gln Ala Asp Gln Ser Ile Tyr Ile Trp Leu Ser  
 1 5 10

<210> 46  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 46

Gln Ala Ser Gln Asn Ile Arg Ile Trp Leu Ser  
 1 5 10

<210> 47  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 47

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp Cys Ser  
 1 5 10

<210> 48  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 48

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp Leu Ser  
 1 5 10

<210> 49  
 <211> 13  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 49

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Asn Asn Trp Leu Ser  
 1 5 10

<210> 50  
 <211> 7  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 50

Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser  
 1 5

<210> 51  
 <211> 7  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 51

Thr Ala Ala Asn Leu Ala Ser  
 1 5

<210> 52  
 <211> 7  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 52

Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser  
 1 5

<210> 53  
 <211> 7  
 <212> Белок

<213> Неизвестный

<220>

<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 53

Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser  
1 5

<210> 54

<211> 7

<212> Белок

<213> Неизвестный

<220>

<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 54

Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ser  
1 5

<210> 55

<211> 7

<212> Белок

<213> Неизвестный

<220>

<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 55

Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser  
1 5

<210> 56

<211> 7

<212> Белок

<213> Неизвестный

<220>

<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 56

Lys Glu Ser Thr Leu Ala Ser  
1 5

<210> 57

<211> 7

<212> Белок

<213> Неизвестный

<220>

<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 57

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser  
1 5

<210> 58  
<211> 7  
<212> Белок  
<213> Неизвестный

<220>  
<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 58

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser  
1 5

<210> 59  
<211> 7  
<212> Белок  
<213> Неизвестный

<220>  
<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 59

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser  
1 5

<210> 60  
<211> 7  
<212> Белок  
<213> Неизвестный

<220>  
<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 60

Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser  
1 5

<210> 61  
<211> 14  
<212> Белок  
<213> Неизвестный

<220>  
<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 61

Gln Ser Asn Tyr Gly Gly Ser Ser Ser Asp Tyr Gly Asn Pro  
1 5 10

<210> 62  
<211> 10  
<212> Белок  
<213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела  
 <400> 62

Gln Asn Phe Ala Thr Ser Asp Thr Val Thr  
 1 5 10

<210> 63  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела  
 <400> 63

Ala Gly Gly Tyr Ser Ser Thr Ser Asp Asn Thr  
 1 5 10

<210> 64  
 <211> 12  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела  
 <400> 64

Gln Asn Asn Tyr Ser Tyr Asn Arg Tyr Gly Ala Pro  
 1 5 10

<210> 65  
 <211> 12  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела  
 <400> 65

Gln Asn Asn Tyr Gly Phe Arg Ser Tyr Gly Gly Ala  
 1 5 10

<210> 66  
 <211> 12  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела  
 <400> 66

Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr Asn Gly Ala Asn  
 1 5 10

<210> 67  
 <211> 12  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 67

Gln Asn Asn Tyr Asp Ser Gly Asn Asn Gly Phe Pro  
 1 5 10

<210> 68  
 <211> 12  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 68

Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr Asn Gly Gly Thr  
 1 5 10

<210> 69  
 <211> 12  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 69

Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr Asn Gly Gly Thr  
 1 5 10

<210> 70  
 <211> 13  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>  
 <223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 70

Gln Ala Asn Tyr Ala Tyr Ser Ala Gly Tyr Gly Ala Ala  
 1 5 10

<210> 71  
 <211> 14  
 <212> Белок  
 <213> Неизвестный

<220>

<223> CDR, происходящий из кроличьего антитела

<400> 71

Gln Asn Asn Tyr His Tyr Ser Ser Ser Thr Asn Gly Gly Thr  
 1 5 10

<210> 72

<211> 112

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 72

Glu Val Val Met Ala Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Ala Ala Val Gly  
 1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly  
 50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys  
 65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Asn Tyr Gly Gly Ser Ser  
 85 90 95

Ser Asp Tyr Gly Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Ala Val Val Lys  
 100 105 110

<210> 73

<211> 108

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 73

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

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser  
 20 25 30

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Thr Ala Ala Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly  
 50 55 60

Ser Arg Ser Gly Ala Ala Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys  
 65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Phe Ala Thr Ser Asp Thr  
 85 90 95

Val Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Thr  
 100 105

- <210> 74
- <211> 111
- <212> Белок
- <213> Искусственная последовательность

- <220>
- <223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

- <400> 74

Ala Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly  
 1 5 10 15

Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Trp Asn Asn  
 20 25 30

Asn Arg Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Ser Gly Gln Pro Pro Lys Leu  
 35 40 45

Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe  
 50 55 60

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val  
 65 70 75 80

Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Ser Ser  
 85 90 95

Thr Ser Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
 100 105 110

- <210> 75
- <211> 110
- <212> Белок
- <213> Искусственная последовательность

- <220>

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 75

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Ala Thr Val Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Ile Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Asn Ile Trp  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys  
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Ser Tyr Asn Arg  
85 90 95

Tyr Gly Ala Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
100 105 110

<210> 76

<211> 110

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 76

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Glu Pro Val Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Ser Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys  
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Asn Asn Tyr Gly Phe Arg Ser  
85 90 95

Tyr Gly Gly Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
 100 105 110

<210> 77  
 <211> 110  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 77

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys  
 65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr  
 85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
 100 105 110

<210> 78  
 <211> 110  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 78

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp  
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Val  
 35 40 45

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Tyr Lys Glu Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys  
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Asp Ser Gly Asn  
85 90 95

Asn Gly Phe Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
100 105 110

<210> 79  
<211> 110  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 79

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly  
1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Asp Gln Ser Ile Tyr Ile Trp  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys  
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr  
85 90 95

Asn Gly Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
100 105 110

<210> 80  
<211> 110  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<400> 80

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly  
1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Arg Ile Trp  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys  
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr  
85 90 95

Asn Gly Gly Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
100 105 110

<210> 81

<211> 111

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 81

Glu Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Ala Ala Val Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp  
20 25 30

Cys Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly His Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys  
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Asn Tyr Ala Tyr Ser Ala  
85 90 95

Gly Tyr Gly Ala Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
 100 105 110

<210> 82  
 <211> 113  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 82

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

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

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Asn Tyr Gly Gly Ser Ser  
 85 90 95

Ser Asp Tyr Gly Asn Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110

Gly

<210> 83  
 <211> 109  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 83

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser  
 20 25 30

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Thr Ala Ala Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Phe Ala Thr Ser Asp Thr  
 85 90 95

Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105

<210> 84  
 <211> 112  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 84

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Trp Asn Asn  
 20 25 30

Asn Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
 35 40 45

Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu  
 65 70 75 80

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Ser Ser  
 85 90 95

Thr Ser Asp Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210> 85  
 <211> 111  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 85

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Asn Ile Trp  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Ser Tyr Asn Arg  
85 90 95

Tyr Gly Ala Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 86

<211> 111

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<400> 86

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Gly Phe Arg Ser  
85 90 95

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Tyr Gly Gly Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210> 87  
 <211> 111  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 87

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr  
 85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210> 88  
 <211> 111  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 88

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp  
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Tyr Lys Glu Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Asp Ser Gly Asn  
85 90 95

Asn Gly Phe Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 89

<211> 111

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 89

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

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

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr  
85 90 95

Asn Gly Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 90

<211> 111

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 90

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Arg Ile Trp  
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr  
 85 90 95

Asn Gly Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210> 91  
 <211> 112  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 91

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp  
 20 25 30

Cys Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Asn Tyr Ala Tyr Ser Ala  
 85 90 95

Gly Tyr Gly Ala Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<210> 92  
 <211> 111  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 92

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Ser Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr  
 85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110

<210> 93  
 <211> 113  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 93

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

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

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Asn Tyr Gly Gly Ser Ser  
85 90 95

Ser Asp Tyr Gly Asn Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

Gly

<210> 94  
<211> 109  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 94

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Thr Ala Ala Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Phe Ala Thr Ser Asp Thr  
85 90 95

Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105

<210> 95  
<211> 112  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<400> 95

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Trp Asn Asn  
20 25 30

Asn Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
35 40 45

Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu  
65 70 75 80

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Ser Ser  
85 90 95

Thr Ser Asp Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 96

<211> 111

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 96

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Asn Ile Trp  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Ser Tyr Asn Arg  
85 90 95

Tyr Gly Ala Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210> 97  
 <211> 111  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 97

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp  
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Gly Phe Arg Ser  
 85 90 95

Tyr Gly Gly Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210> 98  
 <211> 111  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 98

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr  
85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 99

<211> 111

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 99

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Lys Glu Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Tyr Asp Ser Gly Asn  
85 90 95

Asn Gly Phe Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 100

<211> 111

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 100

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

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

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr  
 85 90 95

Asn Gly Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210> 101  
 <211> 111  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 101

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Arg Ile Trp  
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr  
 85 90 95

Asn Gly Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210> 102  
 <211> 112  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 102

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp  
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Asn Tyr Ala Tyr Ser Ala  
 85 90 95

Gly Tyr Gly Ala Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210> 103  
 <211> 111  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 103

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Ser Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr  
85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105 110

<210> 104

<211> 111

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 104

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr  
85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 105

<211> 111

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 105

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

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr  
 85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210> 106  
 <211> 112  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VL-последовательность

<400> 106

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp  
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Asn Tyr Ala Tyr Ser Ala  
 85 90 95

Gly Tyr Gly Ala Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<210> 107  
 <211> 128  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 107

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser  
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Ser Gly Tyr  
 20 25 30

Trp Val Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Ala Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp  
 50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr Ala Tyr  
 100 105 110

Ala Gly Leu Glu Leu Trp Gly Pro Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 108  
 <211> 128  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 108

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser  
 1 5 10 15

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

Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Ala Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp  
 50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr Ala Tyr  
 100 105 110

Ala Gly Leu Glu Leu Trp Gly Pro Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 109  
 <211> 117  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 109

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Ala Ser  
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Cys Met Tyr Thr Gly Ser Tyr Asn Arg Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp  
 50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ser Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr  
 65 70 75 80

Leu Glu Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Lys Gly Ser Asn Trp Tyr Ser Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 110  
 <211> 124

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 110

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

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

Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Ala Cys Ile Asp Ala Gly Ser Ser Gly Ile Leu Val Tyr Ala Asn  
 50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val  
 65 70 75 80

Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe  
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Asp Ala Ser Tyr Gly Val Asp Ser Phe Met Leu Pro  
 100 105 110

Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 111  
 <211> 119  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 111

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

Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe Thr Thr Thr Asp  
 20 25 30

Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Cys Ile Leu Ala Gly Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala  
 50 55 60

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Lys Gly Arg Phe Thr Gly Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu  
65 70 75 80

Lys Met Thr Gly Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala  
85 90 95

Arg Ser Asp Pro Ala Ser Ser Trp Ser Phe Ala Leu Trp Gly Pro Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 112

<211> 117

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 112

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Gly Ala Tyr  
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Tyr Asp Gly Asp Arg Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser  
85 90 95

Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Gly Thr Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu  
100 105 110

Val Thr Val Ser Leu  
115

<210> 113

<211> 117

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 113

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr  
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Leu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asn Leu Lys Met  
65 70 75 80

Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Gly Gly  
85 90 95

Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu  
100 105 110

Val Thr Val Ser Leu  
115

<210> 114

<211> 116

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 114

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

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

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
35 40 45

Ile Ile Gly Pro Gly Asp Tyr Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly  
50 55 60

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr  
65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Arg Gly Asp  
85 90 95

Asp Asn Ser Gly Trp Gly Glu Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Thr Val Ser Leu  
115

<210> 115

<211> 116

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 115

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

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

Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Ile Gly  
35 40 45

Cys Leu Asp Tyr Phe Gly Ser Thr Asp Asp Ala Ser Trp Ala Lys Gly  
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Ala Val Asp Leu Lys Ile Thr  
65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Thr Asp  
85 90 95

Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Thr Val Ser Leu  
115

<210> 116

<211> 116

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 116

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

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

Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
35 40 45

Cys Leu Asp Tyr Val Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly  
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr  
65 70 75 80

Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Thr Asp  
85 90 95

Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Thr Val Ser Leu  
115

<210> 117

<211> 118

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 117

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

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

Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
35 40 45

Ile Ile Ala Pro Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser  
50 55 60

Arg Ser Thr Ile Thr Arg Asp Thr Asn Glu Asn Thr Val Thr Leu Lys  
65 70 75 80

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Met Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg  
 85 90 95

Ser Gly Asp Thr Thr Ala Trp Gly Ala Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Leu  
 115

<210> 118  
 <211> 130  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 118

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

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

Tyr Trp Val Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Val Ser Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser  
 50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Ala Lys Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr  
 100 105 110

Ala Tyr Ala Gly Leu Glu Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 115 120 125

Ser Ser  
 130

<210> 119  
 <211> 130  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 119

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

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

Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Ser Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser  
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr  
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Ala Lys Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr  
100 105 110

Ala Tyr Ala Gly Leu Glu Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
115 120 125

Ser Ser  
130

<210> 120

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 120

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

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

Tyr Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Val Ser Cys Met Tyr Thr Gly Ser Tyr Asn Arg Ala Tyr Tyr Ala Ser  
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr  
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Ala Lys Gly Ser Asn Trp Tyr Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 121  
<211> 125  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 121

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

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

Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Ser Cys Ile Asp Ala Gly Ser Ser Gly Ile Leu Val Tyr Ala Asn  
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr  
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Ala Lys Gly Asp Ala Ser Tyr Gly Val Asp Ser Phe Met Leu  
100 105 110

Pro Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 122  
<211> 121

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 122

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

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

Asp Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Ser Cys Ile Leu Ala Gly Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp  
50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu  
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Lys Ser Asp Pro Ala Ser Ser Trp Ser Phe Ala Leu Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 123

<211> 120

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 123

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Gly Ala  
20 25 30

Tyr Tyr Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Ser Tyr Ile Asp Tyr Asp Gly Asp Arg Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala  
50 55 60

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Ser Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Gly Thr Asp Ile Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 124

<211> 120

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 124

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

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Ser Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 125

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 125

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

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

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ile Ile Gly Pro Gly Asp Tyr Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Lys Gly Asp Asp Asn Ser Gly Trp Gly Glu Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 126

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 126

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr  
20 25 30

Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Cys Leu Asp Tyr Phe Gly Ser Thr Asp Asp Ala Ser Trp Ala Lys  
50 55 60

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Lys Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 127  
<211> 119  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 127

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

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

Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Cys Leu Asp Tyr Val Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Lys Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 128  
<211> 119  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 128

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ile Ile Ala Pro Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys  
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Lys Ser Gly Asp Thr Thr Ala Trp Gly Ala Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 129

<211> 120

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 129

Gln Val Gln Leu Val Gln Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Ser Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80



RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 131

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

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

Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Gly Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser  
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr  
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Asn Tyr Tyr Ile Tyr Thr Asp Gly Gly Tyr  
100 105 110

Ala Tyr Ala Gly Leu Glu Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
115 120 125

Ser Ser  
130

<210> 132

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 132

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Asn  
20 25 30

Tyr Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Val Gly Cys Met Tyr Thr Gly Ser Tyr Asn Arg Ala Tyr Tyr Ala Ser  
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ser Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr  
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Ala Lys Gly Ser Asn Trp Tyr Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 133  
<211> 125  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 133

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

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

Tyr Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Gly Cys Ile Asp Ala Gly Ser Ser Gly Ile Leu Val Tyr Ala Asn  
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr  
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Ala Ser Tyr Gly Val Asp Ser Phe Met Leu  
100 105 110

Pro Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 134  
<211> 121

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 134

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

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

Asp Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Val Gly Cys Ile Leu Ala Gly Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp  
 50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Gly Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val  
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Ser Asp Pro Ala Ser Ser Trp Ser Phe Ala Leu Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 135  
 <211> 120  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 135

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

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

Tyr Tyr Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Val Gly Tyr Ile Asp Tyr Asp Gly Asp Arg Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala  
 50 55 60

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Gly Thr Asp Ile Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 136  
<211> 120  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 136

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

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 137  
<211> 119  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 137

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

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

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Ile Ile Gly Pro Gly Asp Tyr Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Gly Asp Asp Asn Ser Gly Trp Gly Glu Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 138

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 138

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr  
20 25 30

Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Cys Leu Asp Tyr Phe Gly Ser Thr Asp Asp Ala Ser Trp Ala Lys  
50 55 60

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 139  
<211> 119  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 139

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

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

Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Cys Leu Asp Tyr Val Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ala Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 140  
<211> 119  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 140

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

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

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Ile Leu Asp Tyr Val Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ala Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 141

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 141

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Tyr  
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Ile Ile Ala Pro Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys  
50 55 60

Ser Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Ser Gly Asp Thr Thr Ala Trp Gly Ala Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 142

<211> 120

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 142

Gln Val Gln Leu Val Gln Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 143

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<400> 143

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr  
20 25 30

Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Cys Leu Asp Tyr Phe Gly Ser Thr Asp Asp Ala Ser Trp Ala Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Lys Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 144

<211> 120

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 144

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

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 145  
<211> 119  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 145

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Tyr  
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Ile Ile Ala Pro Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys  
50 55 60

Ser Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Ser Gly Asp Thr Thr Ala Trp Gly Ala Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 146  
<211> 120  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 146

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

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

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 147  
 <211> 119  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 147

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

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

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 148  
 <211> 120  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 148

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

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 149  
 <211> 120  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 149

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

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Leu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 150  
<211> 120  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 150

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

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr  
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 151  
 <211> 120  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 151

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

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 152  
 <211> 120  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 152

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

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Ala Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 153  
 <211> 120  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 153

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

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ala Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 154  
 <211> 120  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 154

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

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 155  
 <211> 119  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 155

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

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

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 156

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 156

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

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 157  
<211> 120  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 157

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

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 158  
<211> 120  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 158

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

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

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 159  
 <211> 120  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 159

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

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 160  
 <211> 120  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 160

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

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 161  
 <211> 120  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 161

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

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 162

<211> 120

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 162

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

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<210> 163  
 <211> 120  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 163

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

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 164  
 <211> 120  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 164

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

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 165  
<211> 120  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность

<400> 165

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

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

Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 166  
<211> 120

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-последовательность  
 <400> 166

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 167  
 <211> 381  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VL-акцепторная последовательность  
 <220>  
 <221> CDR  
 <222> (24)..(123)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот  
 <220>  
 <221> CDR  
 <222> (139)..(238)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот  
 <220>  
 <221> CDR  
 <222> (271)..(370)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<400> 167

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa  
 20 25 30

Xaa  
 35 40 45

Xaa  
 50 55 60

Xaa  
 65 70 75 80

Xaa  
 85 90 95

Xaa  
 100 105 110

Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys  
 115 120 125

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 130 135 140

Xaa  
 145 150 155 160

Xaa  
 165 170 175

Xaa  
 180 185 190

Xaa  
 195 200 205

Xaa  
 210 215 220

Xaa Gly Val  
 225 230 235 240

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr  
 245 250 255

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa  
 260 265 270

Xaa  
 275 280 285

Xaa  
 290 295 300

Xaa  
 305 310 315 320

Xaa  
 325 330 335

Xaa  
 340 345 350

Xaa  
 355 360 365

Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 370 375 380

<210> 168

<211> 381

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VL-акцепторная последовательность

<220>

<221> CDR

<222> (24)..(123)

<223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот

<220>

<221> CDR

<222> (139)..(238)

<223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот

<220>

<221> CDR

<222> (271)..(370)

<223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот

<400> 168

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa  
 20 25 30

Xaa  
 35 40 45

Xaa  
 50 55 60

Xaa  
 65 70 75 80

Xaa  
 85 90 95

Xaa  
 100 105 110

Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys  
 115 120 125

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 130 135 140

Xaa  
 145 150 155 160

Xaa  
 165 170 175

Xaa  
 180 185 190

Xaa  
 195 200 205

Xaa  
 210 215 220

Xaa Gly Val  
 225 230 235 240

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr  
 245 250 255

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa  
 260 265 270

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Xaa  
 275 280 285

Xaa  
 290 295 300

Xaa  
 305 310 315 320

Xaa  
 325 330 335

Xaa  
 340 345 350

Xaa  
 355 360 365

Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 370 375 380

<210> 169  
 <211> 382  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-акцепторная последовательность

<220>  
 <221> CDR  
 <222> (26)..(125)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<220>  
 <221> CDR  
 <222> (140)..(239)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<220>  
 <221> CDR  
 <222> (272)..(371)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<400> 169

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30

Xaa  
 35 40 45

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Xaa  
50 55 60

Xaa  
65 70 75 80

Xaa  
85 90 95

Xaa  
100 105 110

Xaa Trp Val Arg  
115 120 125

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
130 135 140

Xaa  
145 150 155 160

Xaa  
165 170 175

Xaa  
180 185 190

Xaa  
195 200 205

Xaa  
210 215 220

Xaa Arg  
225 230 235 240

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met  
245 250 255

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Xaa  
260 265 270

Xaa  
275 280 285

Xaa  
290 295 300

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Xaa  
 305 310 315 320

Xaa  
 325 330 335

Xaa  
 340 345 350

Xaa  
 355 360 365

Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 370 375 380

<210> 170

<211> 381

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Рекомбинантный scFv - VH-акцепторная последовательность

<220>

<221> CDR

<222> (26)..(125)

<223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<220>

<221> CDR

<222> (140)..(239)

<223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<220>

<221> CDR

<222> (272)..(371)

<223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<400> 170

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30

Xaa  
 35 40 45

Xaa  
 50 55 60

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Xaa  
65 70 75 80

Xaa  
85 90 95

Xaa  
100 105 110

Xaa Trp Val Arg  
115 120 125

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
130 135 140

Xaa  
145 150 155 160

Xaa  
165 170 175

Xaa  
180 185 190

Xaa  
195 200 205

Xaa  
210 215 220

Xaa Arg  
225 230 235 240

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met  
245 250 255

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa  
260 265 270

Xaa  
275 280 285

Xaa  
290 295 300

Xaa  
305 310 315 320

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Xaa  
 325 330 335

Xaa  
 340 345 350

Xaa  
 355 360 365

Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 370 375 380

<210> 171  
 <211> 382  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - VH-акцепторная последовательность

<220>  
 <221> CDR  
 <222> (26)..(125)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<220>  
 <221> CDR  
 <222> (140)..(239)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<220>  
 <221> CDR  
 <222> (272)..(371)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<400> 171

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30

Xaa  
 35 40 45

Xaa  
 50 55 60

Xaa  
 65 70 75 80

Xaa  
 85 90 95

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Xaa  
 100 105 110

Xaa Trp Val Arg  
 115 120 125

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 130 135 140

Xaa  
 145 150 155 160

Xaa  
 165 170 175

Xaa  
 180 185 190

Xaa  
 195 200 205

Xaa  
 210 215 220

Xaa Arg  
 225 230 235 240

Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met  
 245 250 255

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa  
 260 265 270

Xaa  
 275 280 285

Xaa  
 290 295 300

Xaa  
 305 310 315 320

Xaa  
 325 330 335

Xaa  
 340 345 350

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Xaa  
 355 360 365

Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 370 375 380

<210> 172  
 <211> 783  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv - акцепторная последовательность

<220>  
 <221> CDR  
 <222> (24)..(123)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<220>  
 <221> CDR  
 <222> (139)..(238)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<220>  
 <221> CDR  
 <222> (271)..(370)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<220>  
 <221> CDR  
 <222> (427)..(526)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<220>  
 <221> CDR  
 <222> (541)..(640)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<220>  
 <221> CDR  
 <222> (673)..(772)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<400> 172

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30

Xaa  
 35 40 45

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Xaa  
50 55 60

Xaa  
65 70 75 80

Xaa  
85 90 95

Xaa  
100 105 110

Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys  
115 120 125

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
130 135 140

Xaa  
145 150 155 160

Xaa  
165 170 175

Xaa  
180 185 190

Xaa  
195 200 205

Xaa  
210 215 220

Xaa Gly Val  
225 230 235 240

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr  
245 250 255

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa  
260 265 270

Xaa  
275 280 285

Xaa  
290 295 300

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Xaa  
 305 310 315 320

Xaa  
 325 330 335

Xaa  
 340 345 350

Xaa  
 355 360 365

Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly  
 370 375 380

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 385 390 395 400

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 405 410 415

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 420 425 430

Xaa  
 435 440 445

Xaa  
 450 455 460

Xaa  
 465 470 475 480

Xaa  
 485 490 495

Xaa  
 500 505 510

Xaa Trp Val  
 515 520 525

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa  
 530 535 540

Xaa  
 545 550 555 560

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Xaa  
565 570 575

Xaa  
580 585 590

Xaa  
595 600 605

Xaa  
610 615 620

Xaa  
625 630 635 640

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
645 650 655

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys  
660 665 670

Xaa  
675 680 685

Xaa  
690 695 700

Xaa  
705 710 715 720

Xaa  
725 730 735

Xaa  
740 745 750

Xaa  
755 760 765

Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
770 775 780

<210> 173  
<211> 783  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Рекомбинантный scFv - акцепторная последовательность

<220>  
 <221> CDR  
 <222> (24)..(123)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<220>  
 <221> CDR  
 <222> (139)..(238)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<220>  
 <221> CDR  
 <222> (271)..(370)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<220>  
 <221> CDR  
 <222> (427)..(526)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<220>  
 <221> CDR  
 <222> (541)..(640)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<220>  
 <221> CDR  
 <222> (673)..(772)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот.

<400> 173

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Xaa  
 20 25 30

Xaa  
 35 40 45

Xaa  
 50 55 60

Xaa  
 65 70 75 80

Xaa  
 85 90 95

Xaa  
 100 105 110

Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys  
 115 120 125

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 130 135 140

Xaa  
 145 150 155 160

Xaa  
 165 170 175

Xaa  
 180 185 190

Xaa  
 195 200 205

Xaa  
 210 215 220

Xaa Gly Val  
 225 230 235 240

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr  
 245 250 255

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa  
 260 265 270

Xaa  
 275 280 285

Xaa  
 290 295 300

Xaa  
 305 310 315 320

Xaa  
 325 330 335

Xaa  
 340 345 350

Xaa  
 355 360 365

Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly  
 370 375 380

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly  
 385 390 395 400

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 405 410 415

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 420 425 430 435 440 445

Xaa  
 450 455 460

Xaa  
 465 470 475 480

Xaa  
 485 490 495

Xaa  
 500 505 510

Xaa Trp Val  
 515 520 525

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa  
 530 535 540

Xaa  
 545 550 555 560

Xaa  
 565 570 575

Xaa  
 580 585 590

Xaa  
 595 600 605

Xaa  
 610 615 620

Xaa  
 625 630 635 640

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
 645 650 655

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 660 665 670

Xaa  
 675 680 685

Xaa  
 690 695 700

Xaa  
 705 710 715 720

Xaa  
 725 730 735

Xaa  
 740 745 750

Xaa  
 755 760 765

Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 770 775 780

- <210> 174
- <211> 783
- <212> Белок
- <213> Искусственная последовательность

- <220>
- <223> Рекомбинантный scFv - акцепторная последовательность

- <220>
- <221> CDR
- <222> (24)..(123)
- <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот

- <220>
- <221> CDR
- <222> (139)..(238)
- <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот

- <220>
- <221> CDR
- <222> (271)..(370)
- <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот

- <220>
- <221> CDR
- <222> (427)..(526)

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот  
 <220>  
 <221> CDR  
 <222> (541)..(640)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот  
 <220>  
 <221> CDR  
 <222> (673)..(772)  
 <223> Могут присутствовать по меньшей мере 3 и до 50 аминокислот  
 <400> 174

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

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Xaa  
 210 215 220

Xaa Gly Val  
 225 230 235 240

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr  
 245 250 255

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa  
 260 265 270

Xaa  
 275 280 285

Xaa  
 290 295 300

Xaa  
 305 310 315 320

Xaa  
 325 330 335

Xaa  
 340 345 350

Xaa  
 355 360 365

Xaa Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly  
 370 375 380

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 385 390 395 400

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 405 410 415

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 420 425 430

Xaa  
 435 440 445

Xaa  
 450 455 460

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Xaa  
465 470 475 480

Xaa  
485 490 495

Xaa  
500 505 510

Xaa Trp Val  
515 520 525

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa  
530 535 540

Xaa  
545 550 555 560

Xaa  
565 570 575

Xaa  
580 585 590

Xaa  
595 600 605

Xaa  
610 615 620

Xaa  
625 630 635 640

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
645 650 655

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
660 665 670

Xaa  
675 680 685

Xaa  
690 695 700

Xaa  
705 710 715 720

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Xaa  
 725 730 735

Xaa  
 740 745 750

Xaa  
 755 760 765

Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 770 775 780

- <210> 175
- <211> 248
- <212> Белок
- <213> Искусственная последовательность
- <220>
- <223> Рекомбинантный scFv
- <400> 175

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Thr Ala Ala Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Arg Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Phe Ala Thr Ser Asp Thr  
 85 90 95

Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly  
 100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 115 120 125

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 130 135 140

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

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

Asn Tyr Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 165 170 175

Trp Val Gly Cys Met Tyr Thr Gly Ser Tyr Asn Arg Ala Tyr Tyr Ala  
 180 185 190

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ser Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn  
 195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Ser Asn Trp Tyr Ser Asp Leu Trp Gly Gln  
 225 230 235 240

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 245

<210> 176  
 <211> 251  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv

<400> 176

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ile Trp  
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Asn Tyr Ala Tyr Ser Ala  
 85 90 95

Gly Tyr Gly Ala Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val  
 130 135 140

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser  
 145 150 155 160

Leu Asn Thr Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
 165 170 175

Leu Glu Trp Val Gly Ile Ile Ala Pro Asp Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala  
 180 185 190

Ser Trp Ala Lys Ser Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn  
 195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Asp Thr Thr Ala Trp Gly Ala Asp Ile  
 225 230 235 240

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 245 250

<210> 177  
 <211> 250  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv

<400> 177

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

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

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Asn Ala His Tyr Ser Thr  
85 90 95

Asn Gly Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly  
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu  
145 150 155 160

Ser Asp Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
165 170 175

Glu Trp Val Ser Cys Leu Asp Tyr Phe Gly Ser Thr Asp Asp Ala Ser  
180 185 190

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr  
195 200 205

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
210 215 220

Tyr Cys Ala Lys Thr Asp Asp Ser Arg Gly Trp Gly Leu Asn Ile Trp  
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
245 250

<210> 178  
<211> 251  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> РЕКОМБИНАНТНЫЙ scFv

<400> 178

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp  
20 25 30

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr  
 85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly  
 100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu  
 145 150 155 160

Thr Asp Tyr Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
 165 170 175

Leu Glu Trp Val Ser Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala  
 180 185 190

Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
 195 200 205

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile  
 225 230 235 240

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 245 250

<210> 179  
 <211> 251  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

<223> Рекомбинантный scFv

<400> 179

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr  
85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly  
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu  
145 150 155 160

Thr Asp Tyr Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
165 170 175

Leu Glu Trp Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala  
180 185 190

Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn  
195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile  
225 230 235 240

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 245 250

<210> 180  
 <211> 251  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Рекомбинантный scFv

<400> 180

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr  
 85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly  
 100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu  
 145 150 155 160

Thr Asp Tyr Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
 165 170 175

Leu Glu Trp Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala  
 180 185 190

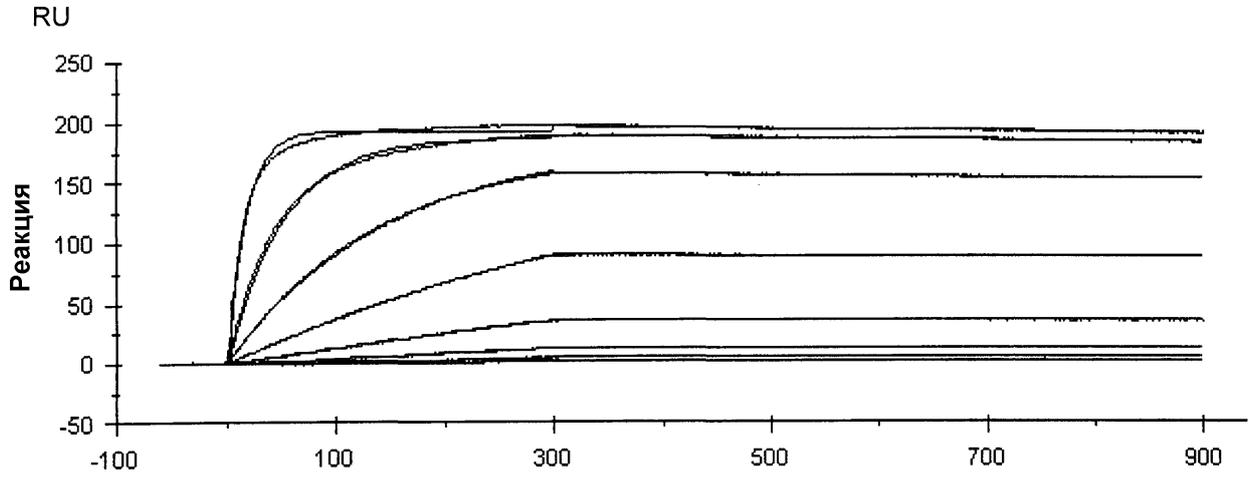
Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn  
 195 200 205

RU 2 531 523 C9 (W1 C2)

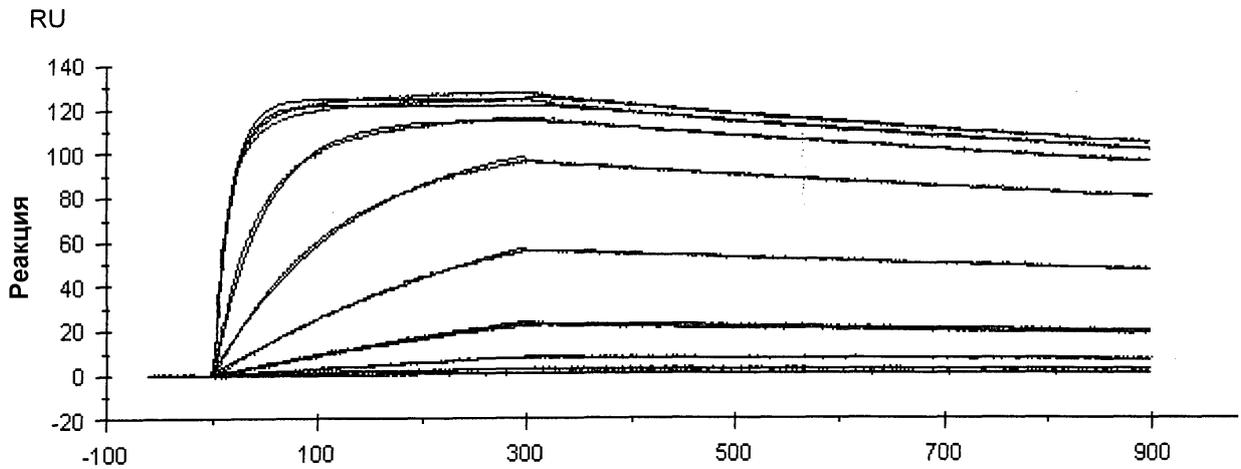
Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile  
 225 230 235 240

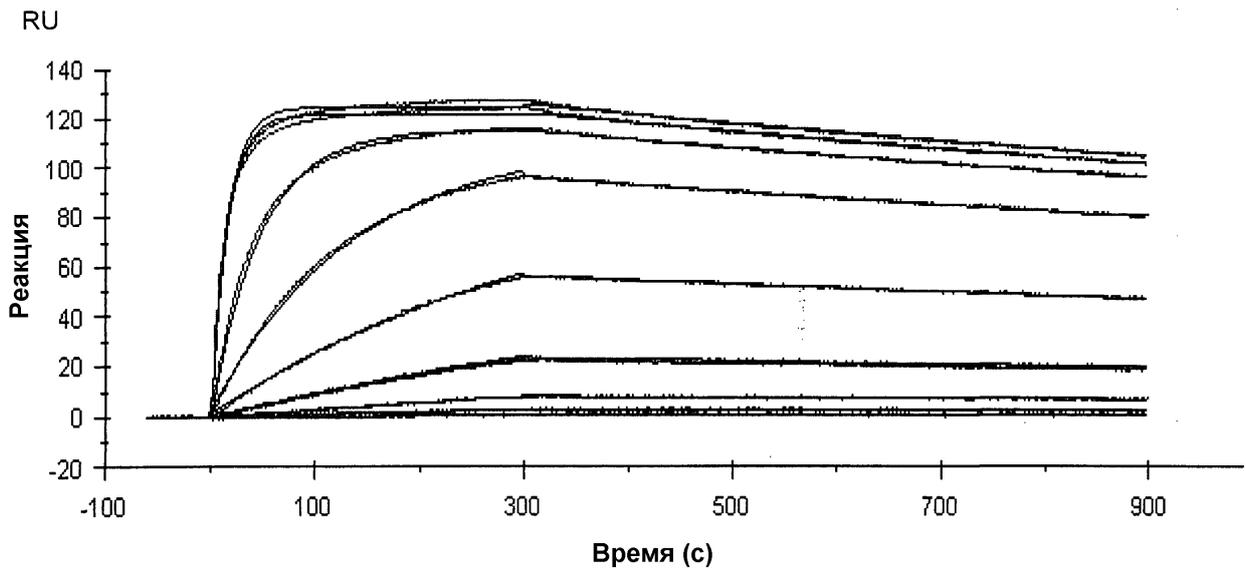
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 245 250



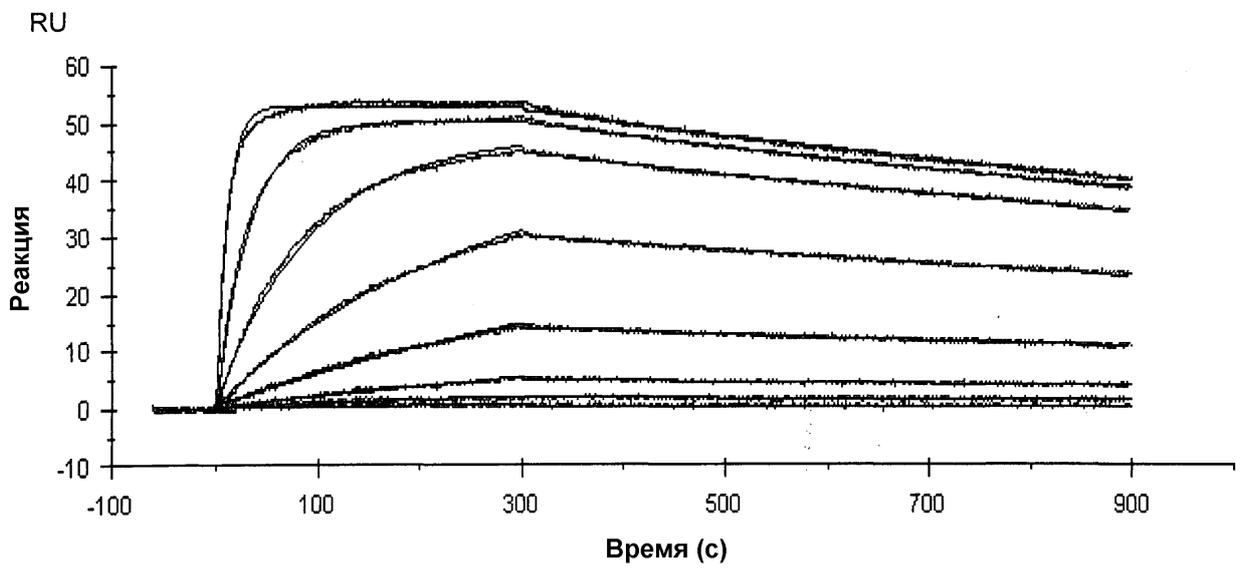
Время (с)  
 ФИГ. 1а



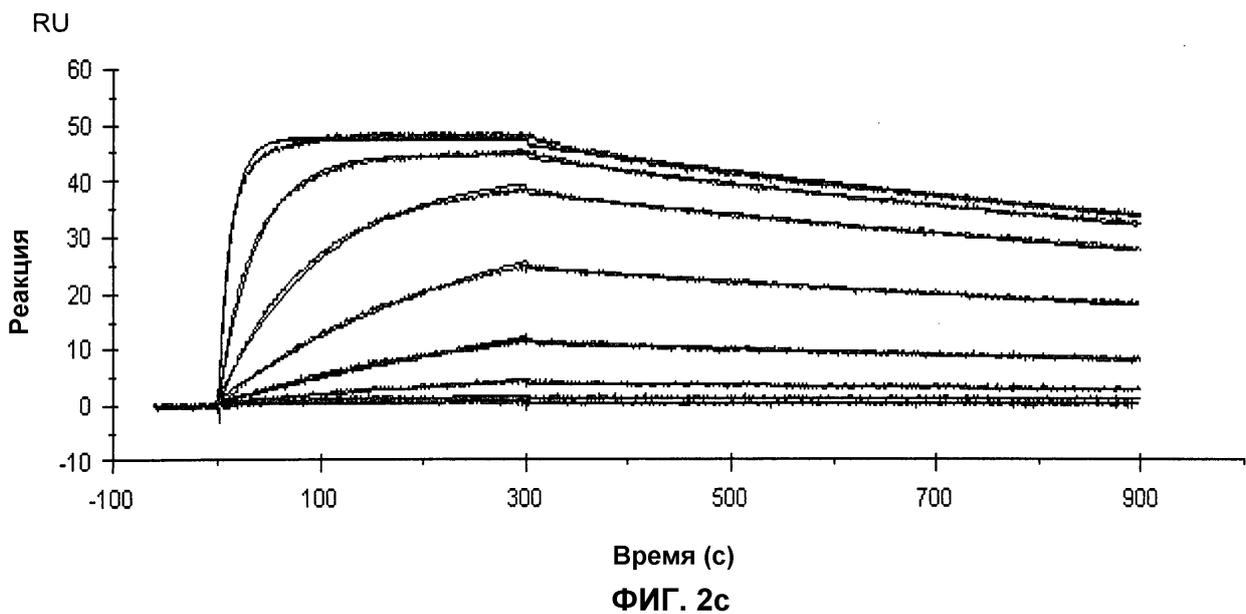
Время (с)  
 ФИГ. 1б

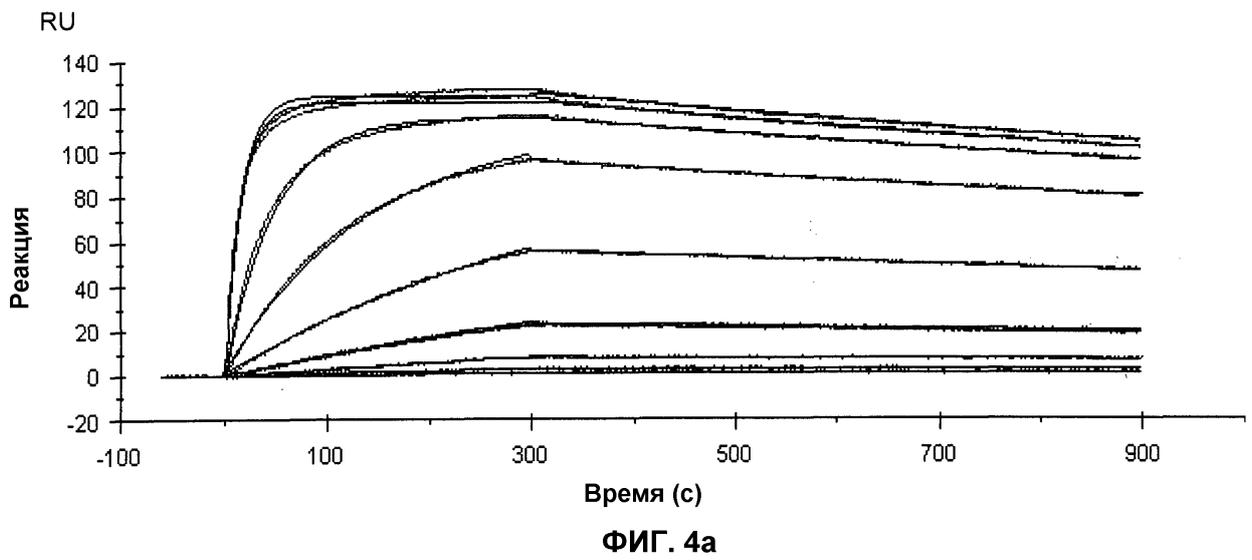
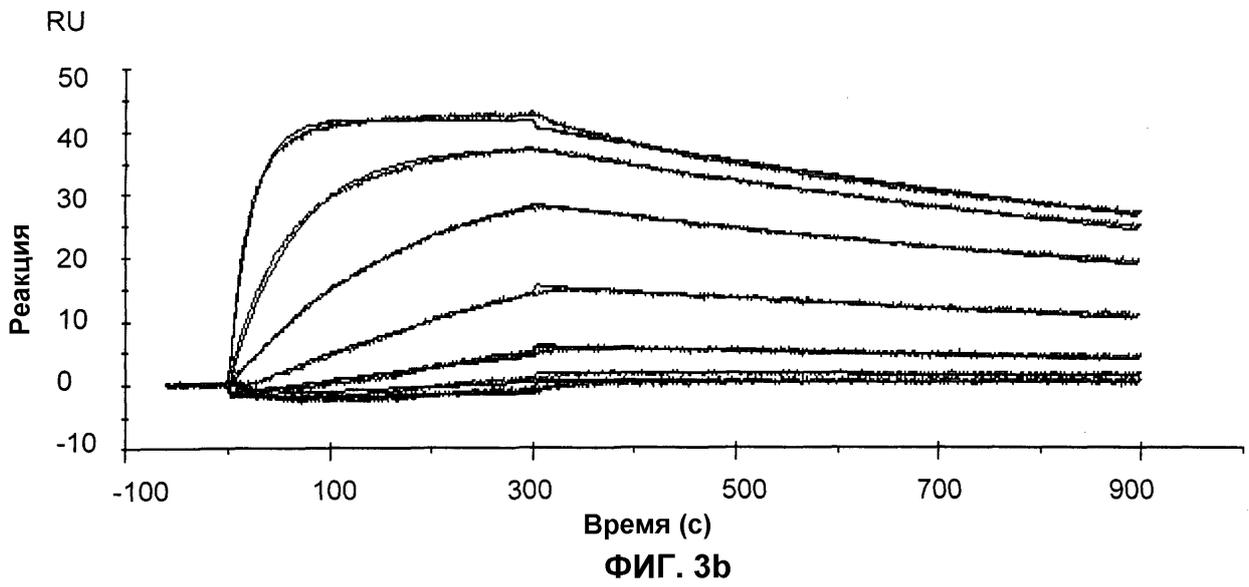
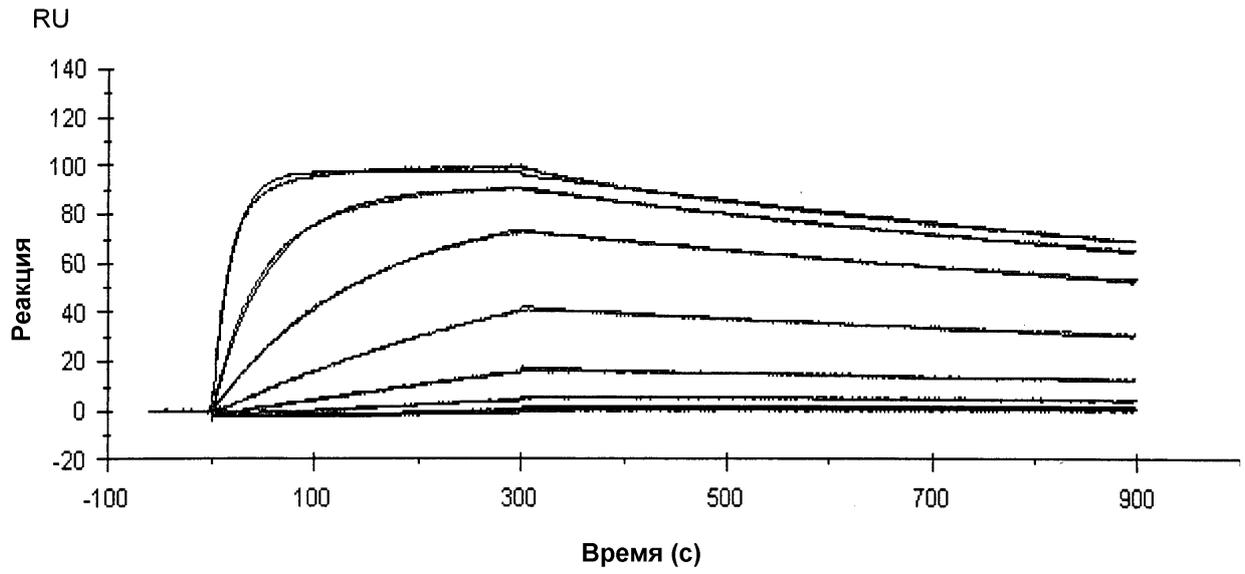


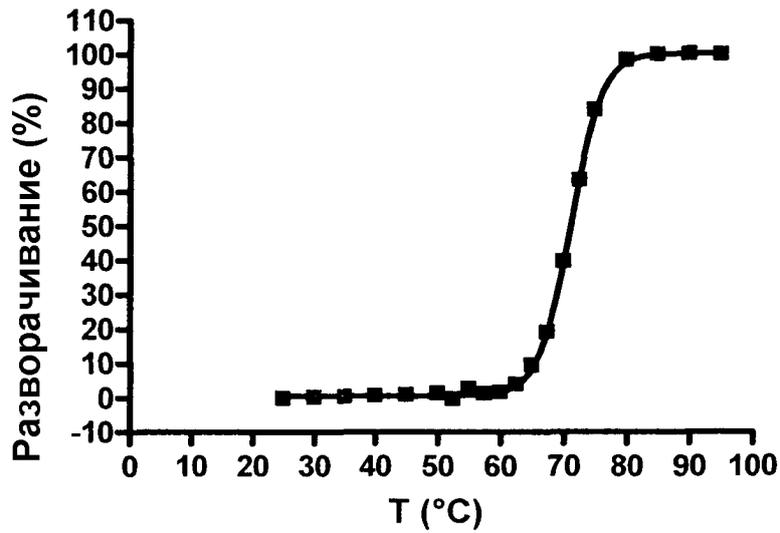
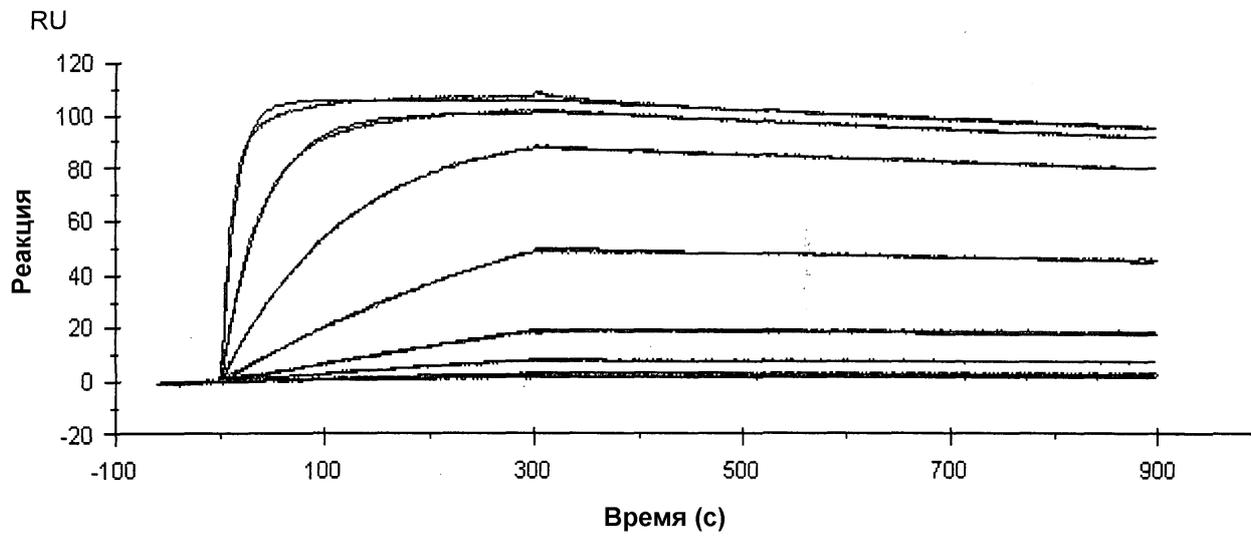
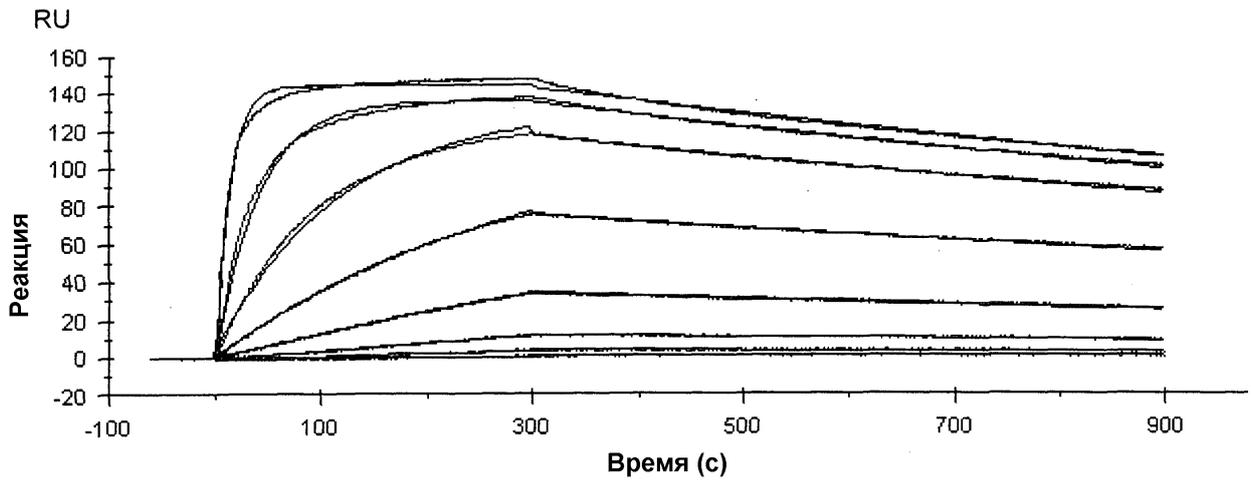
ФИГ. 2а

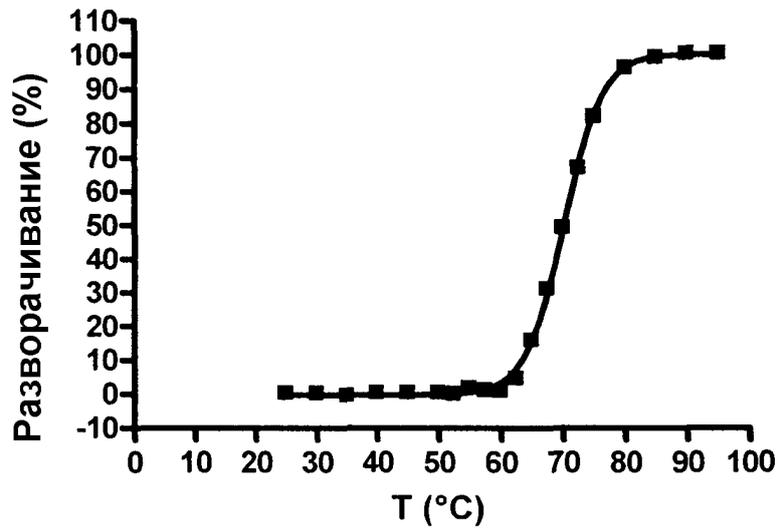


ФИГ. 2б

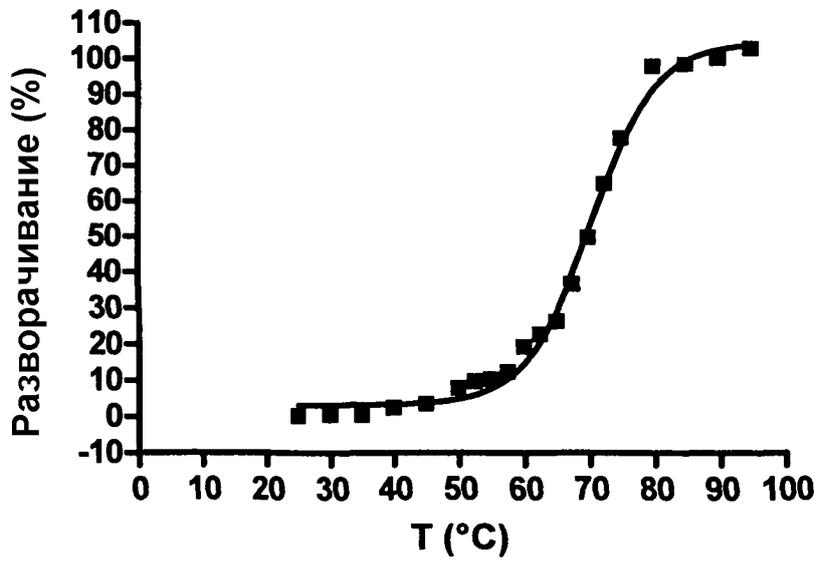






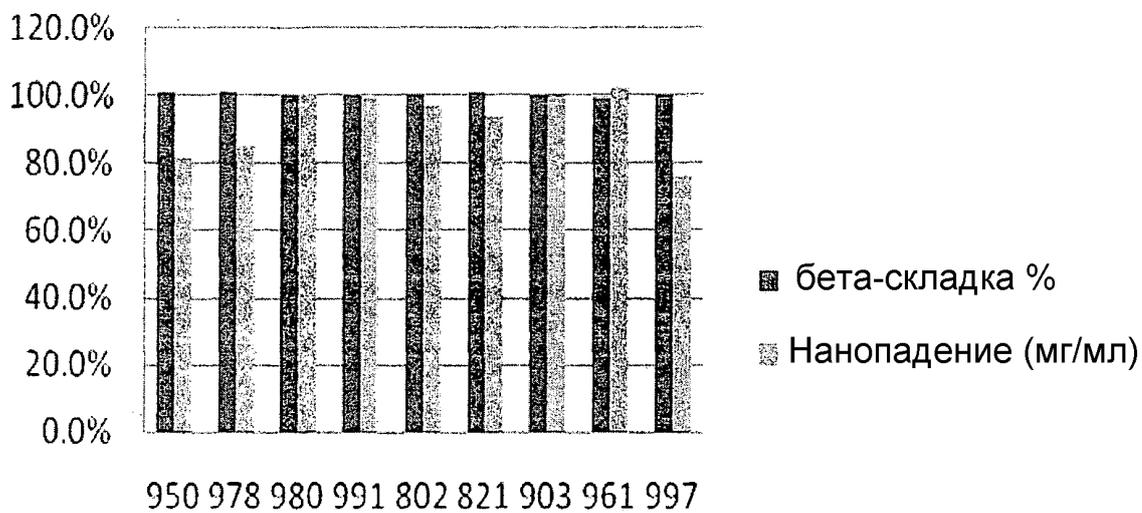


ФИГ. 5b



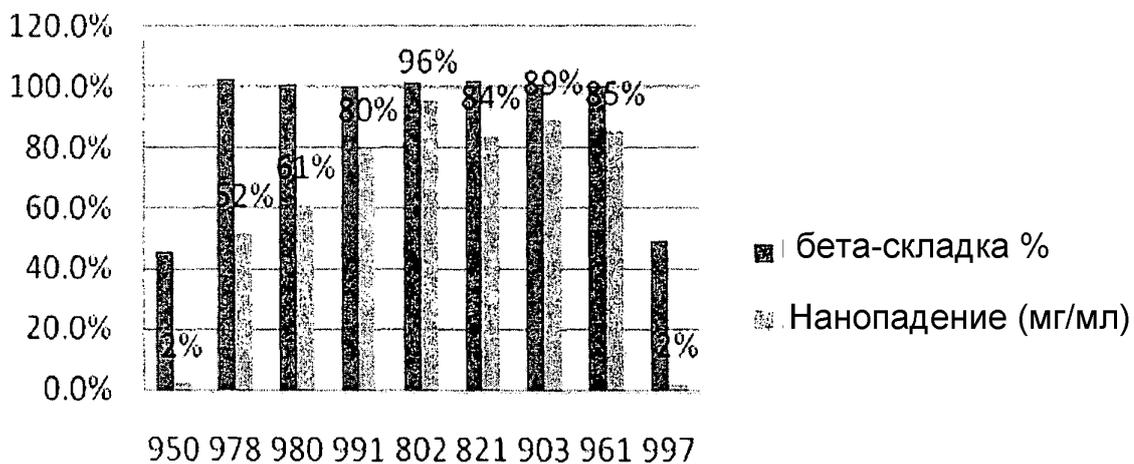
ФИГ. 5c

Величины, нормализованные относительно нативного белка (%)



ID иммуносвязывающих агентов  
**ФИГ. 6а**

Величины, нормализованные относительно нативного белка (%)

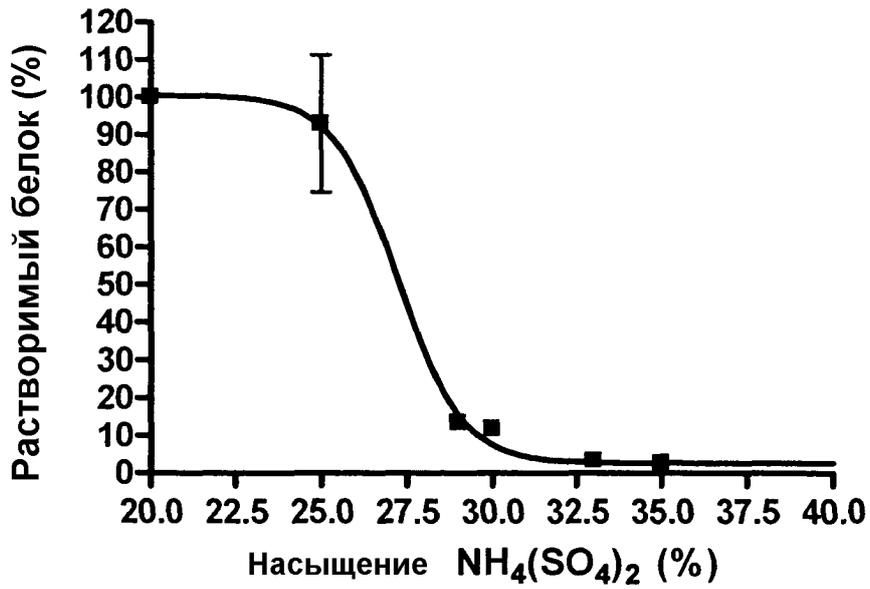


ID иммуносвязывающих агентов  
**ФИГ. 6б**

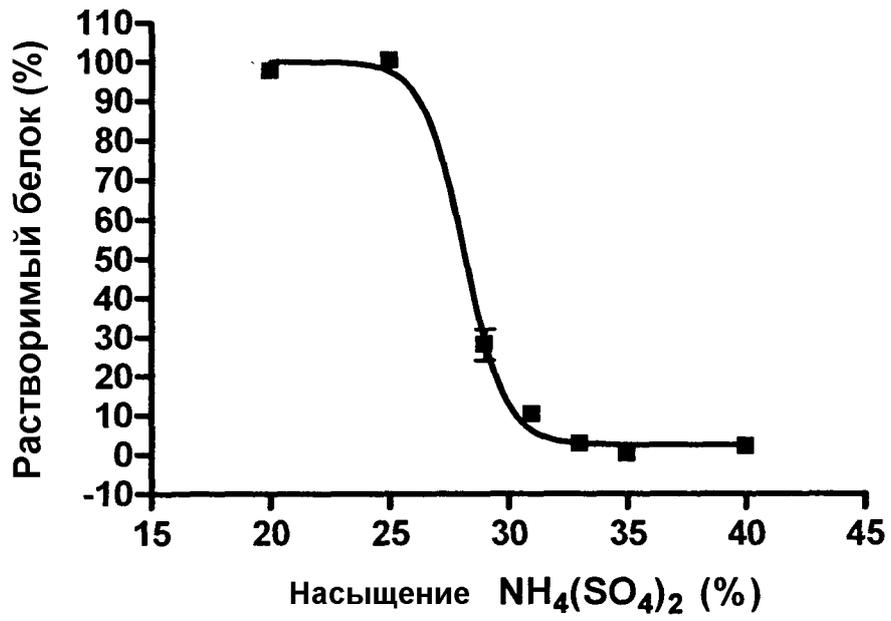
Величины, нормализованные относительно нативного белка (%)



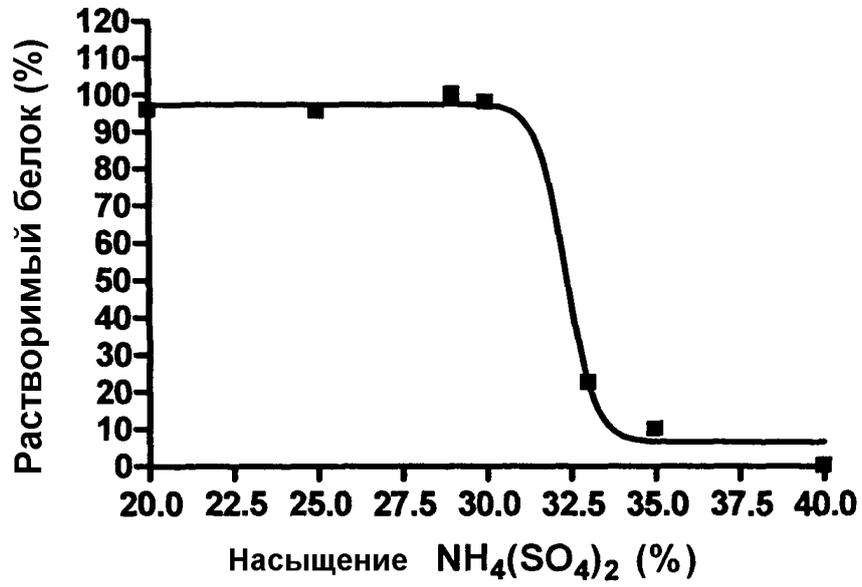
ФИГ. 6с



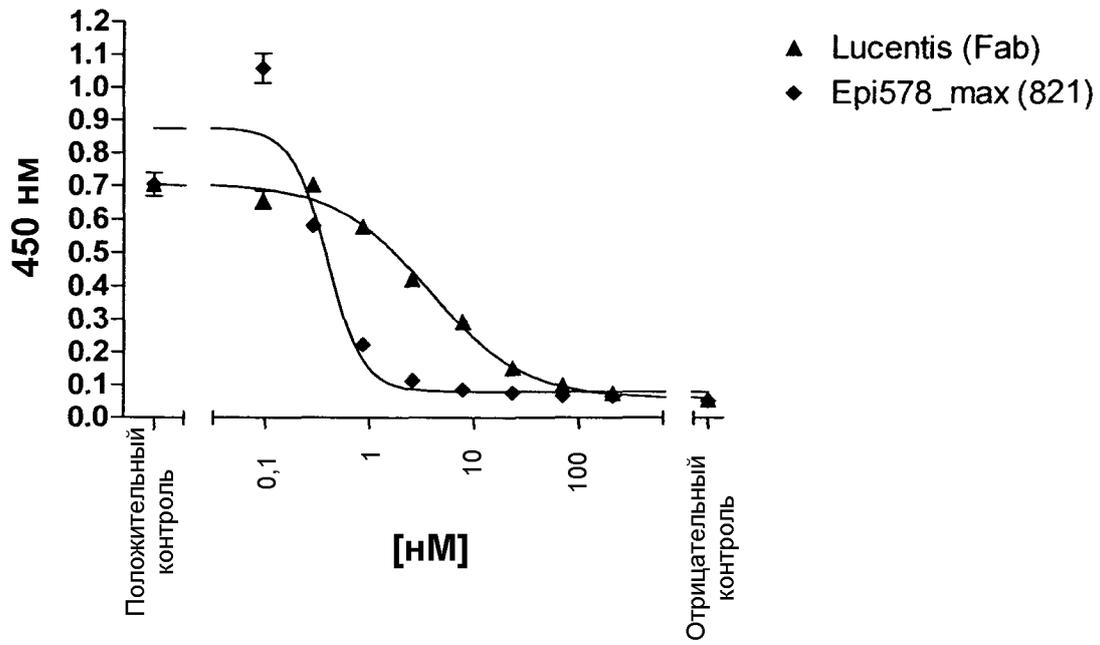
ФИГ. 7а



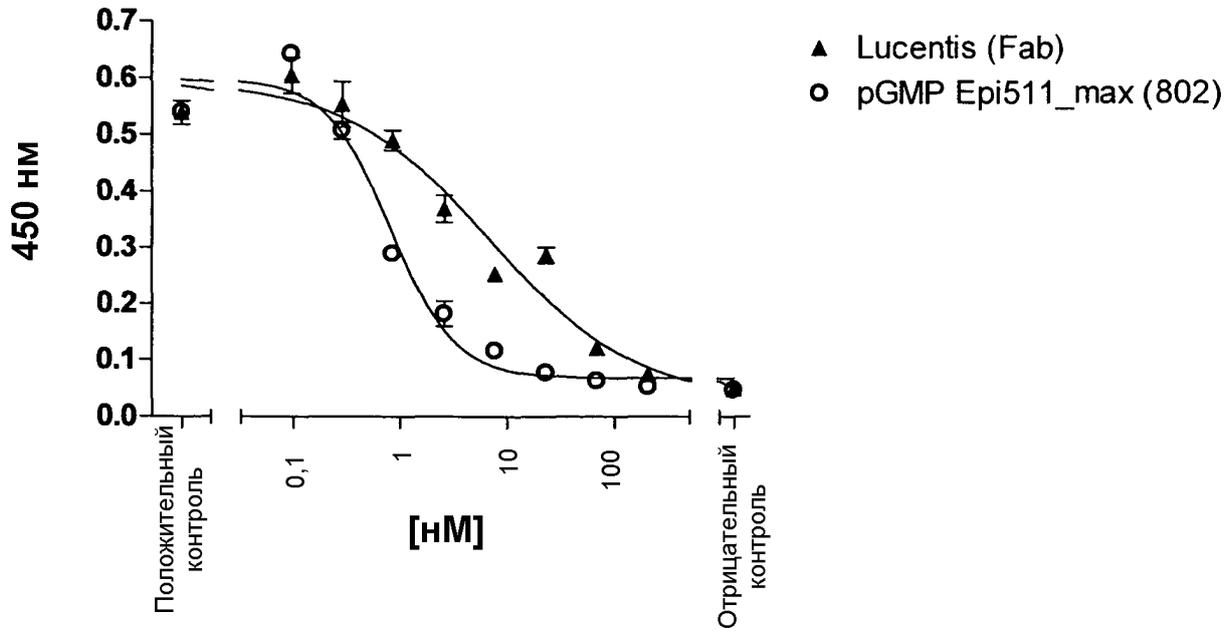
ФИГ. 7b



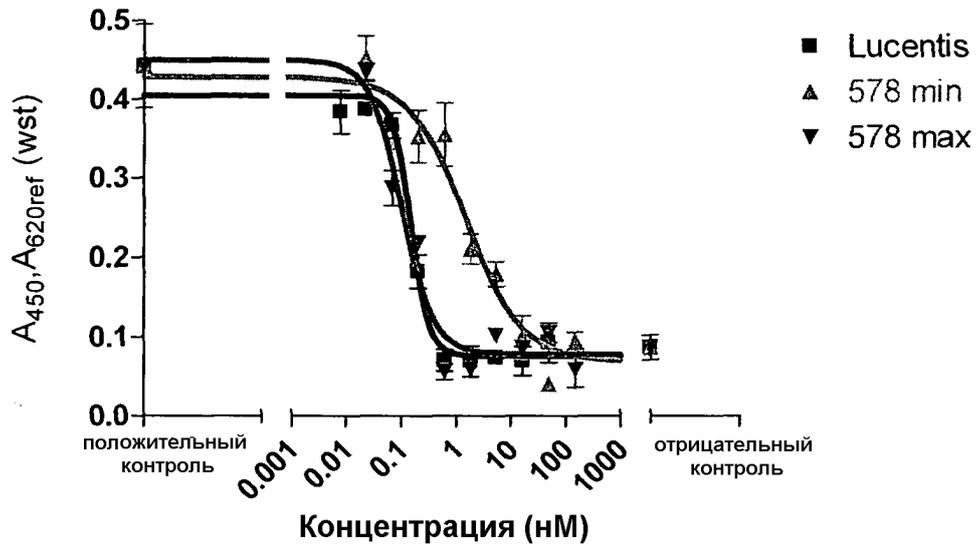
ФИГ. 7c



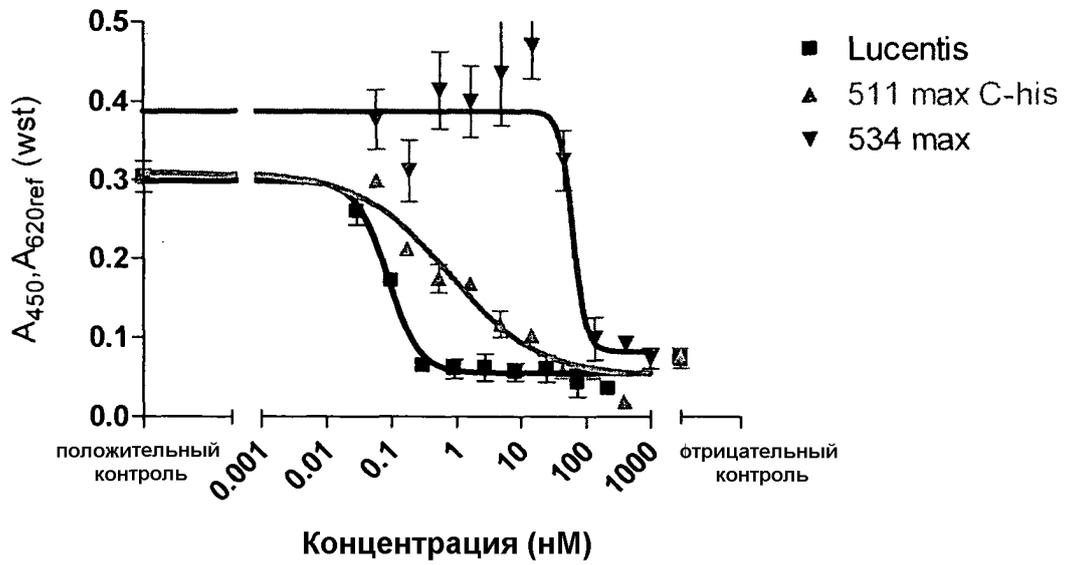
ФИГ. 8а



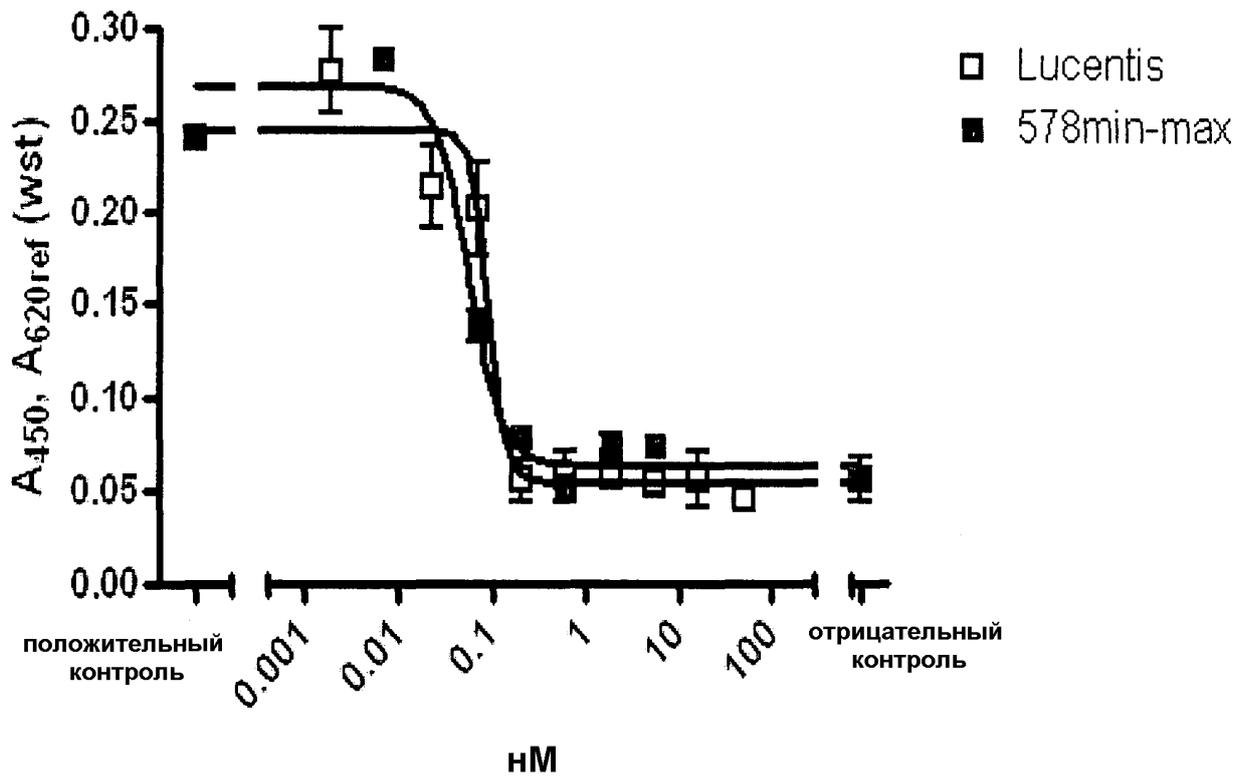
ФИГ. 8b



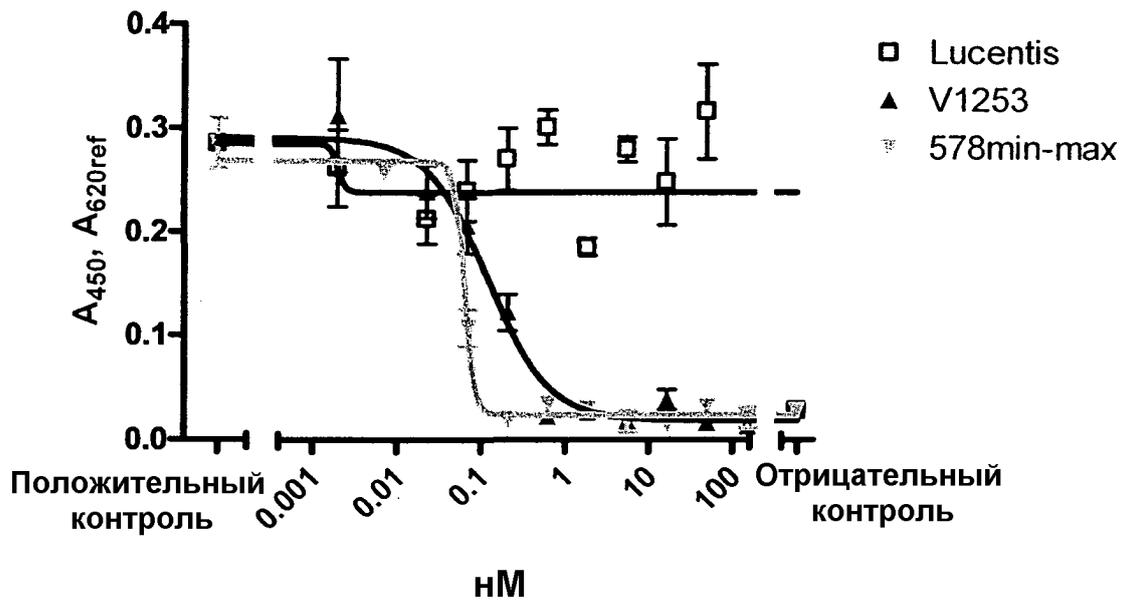
ФИГ. 8с



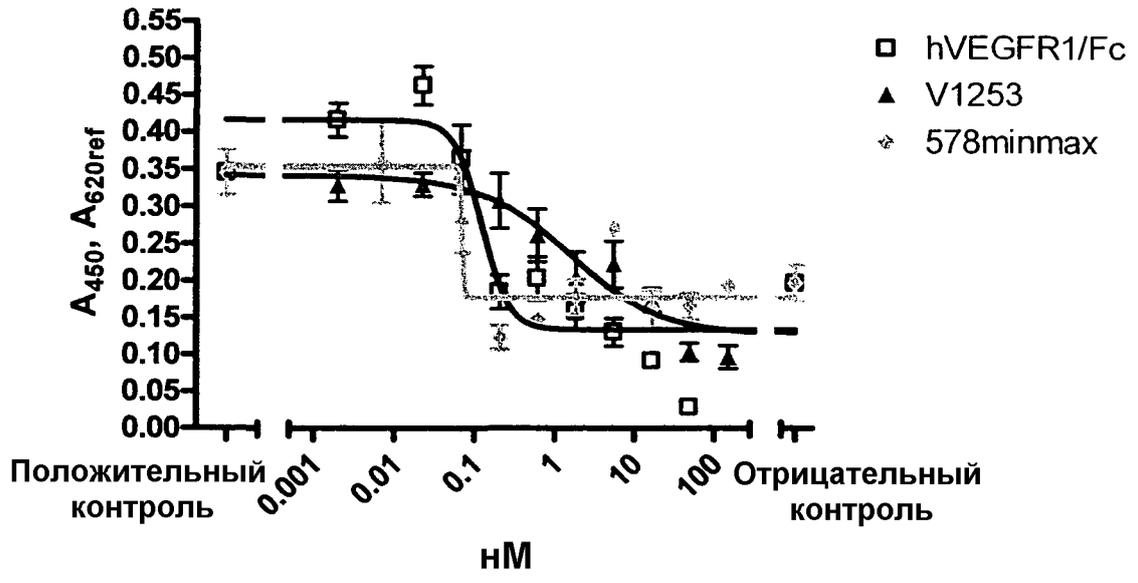
ФИГ. 8d



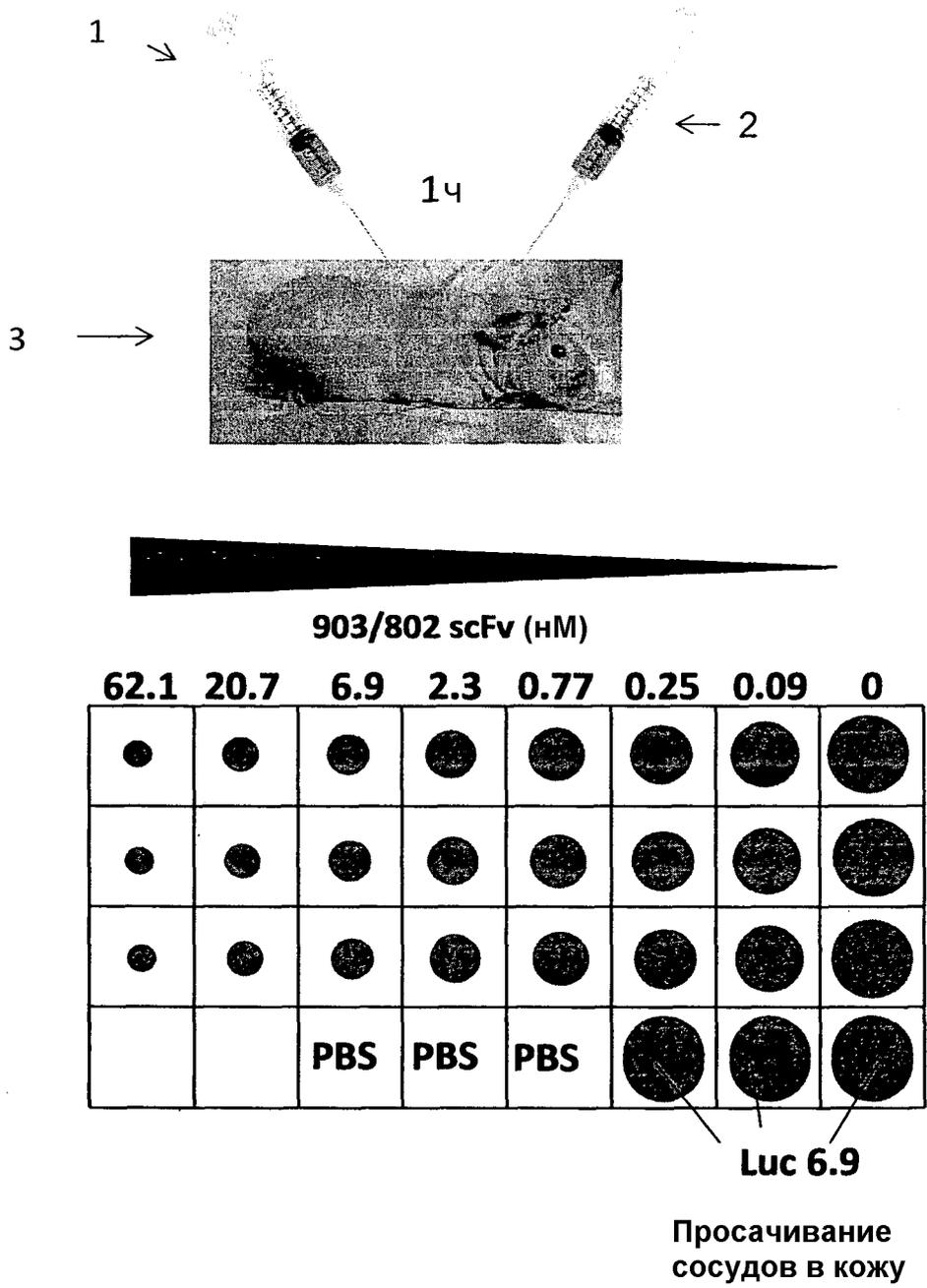
ФИГ. 9



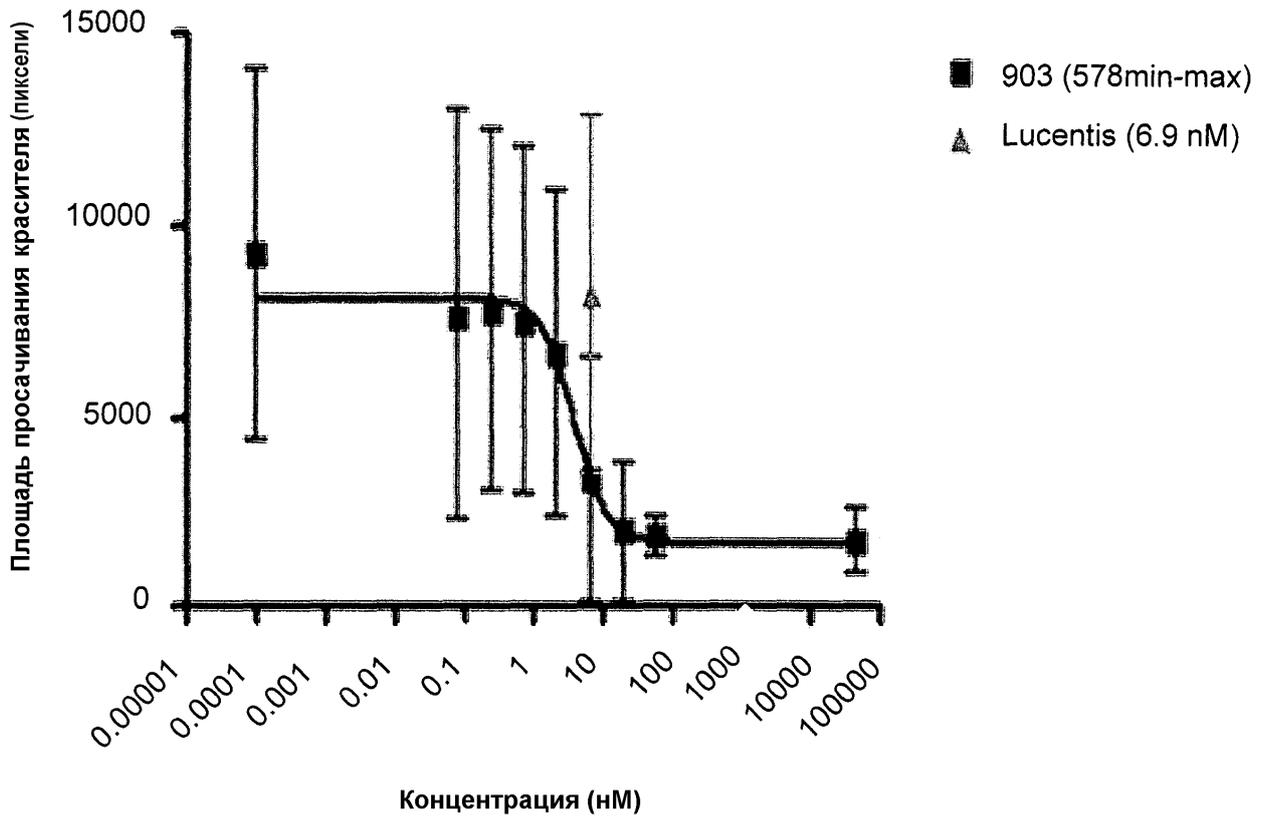
ФИГ. 10а



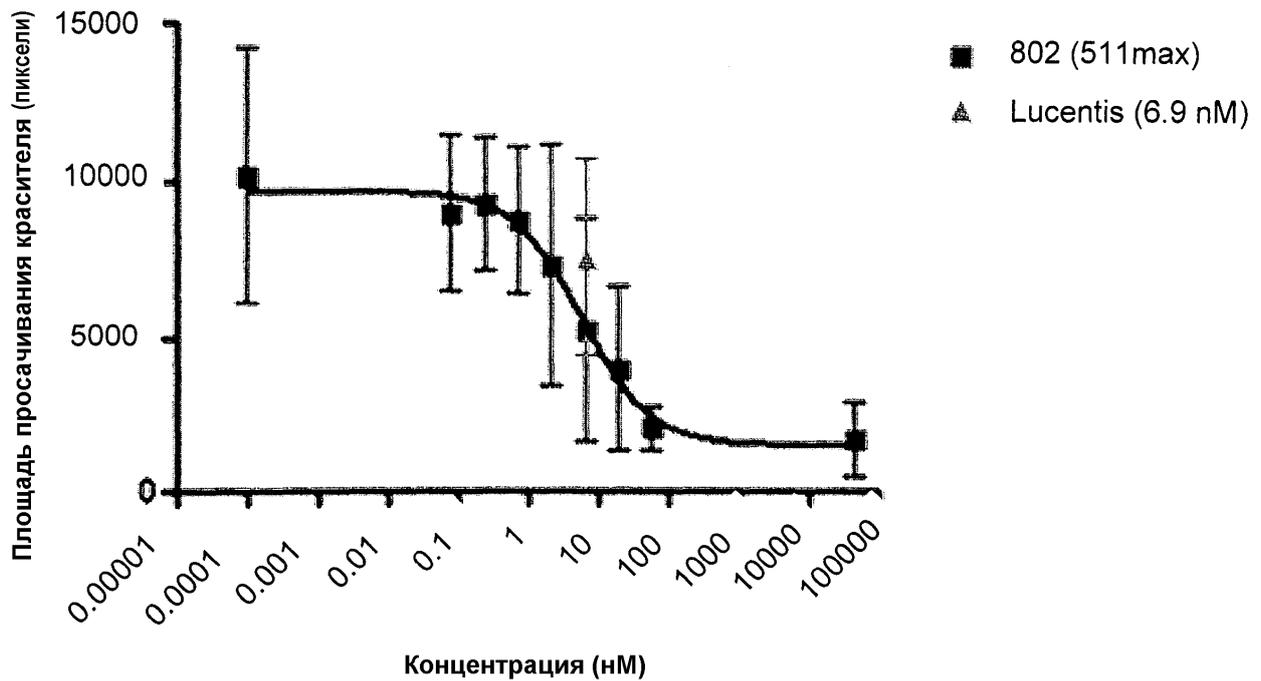
ФИГ. 10b



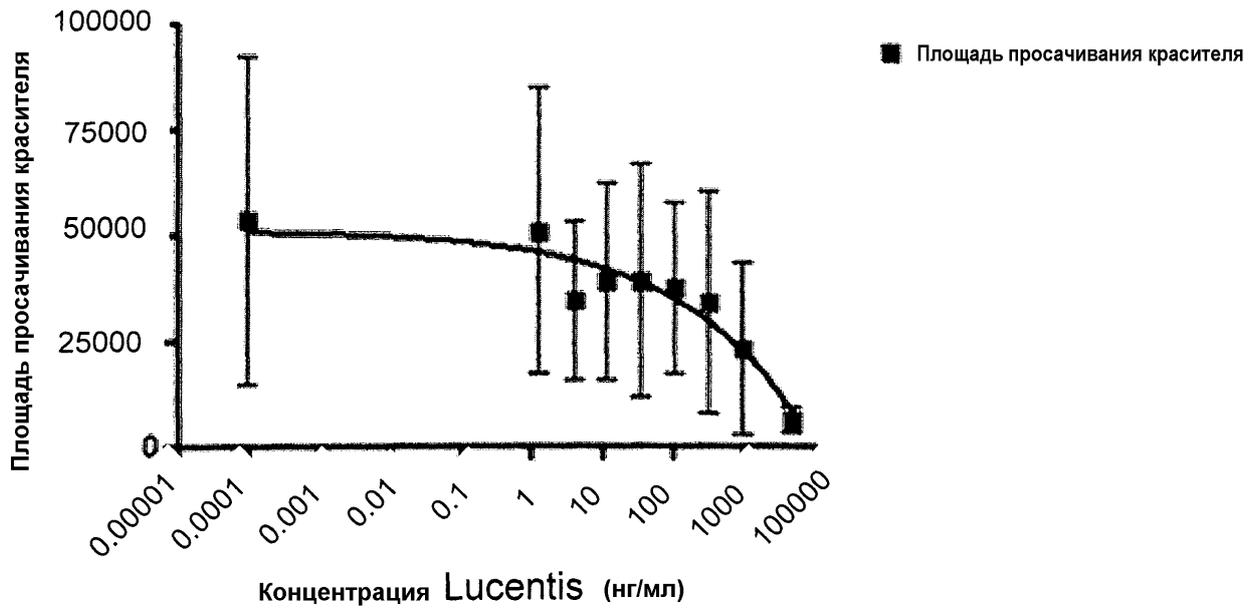
ФИГ. 11



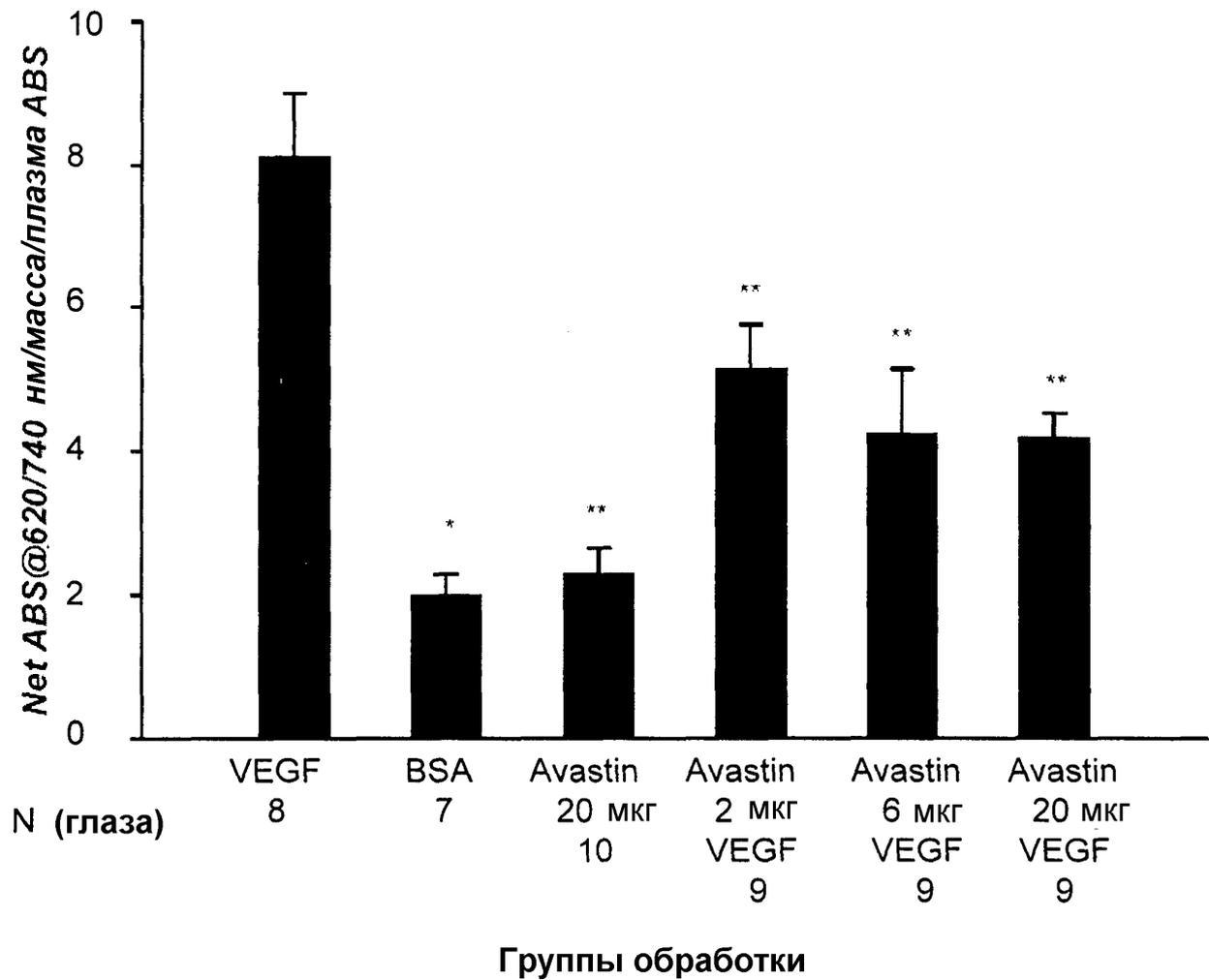
ФИГ. 12а



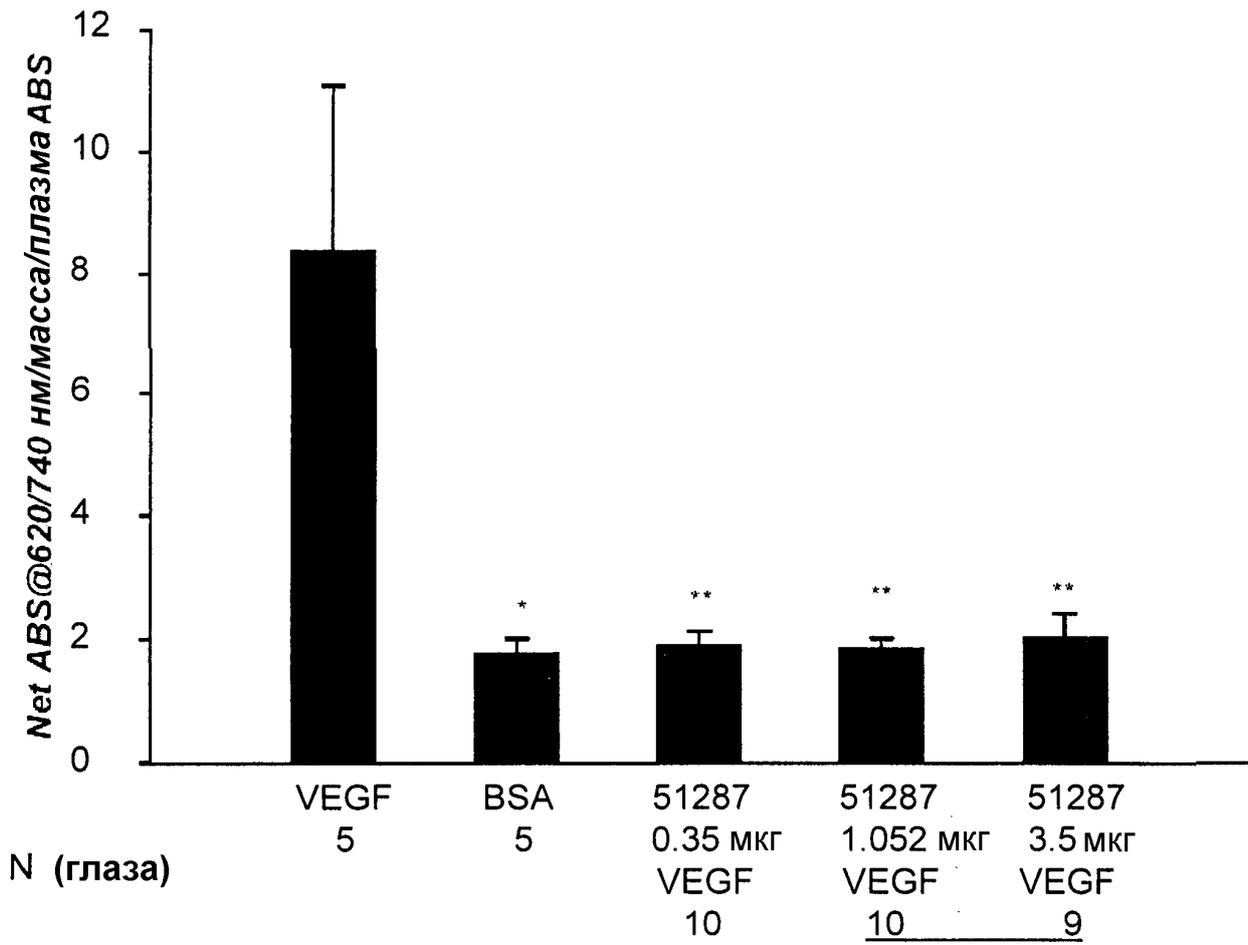
ФИГ. 12b



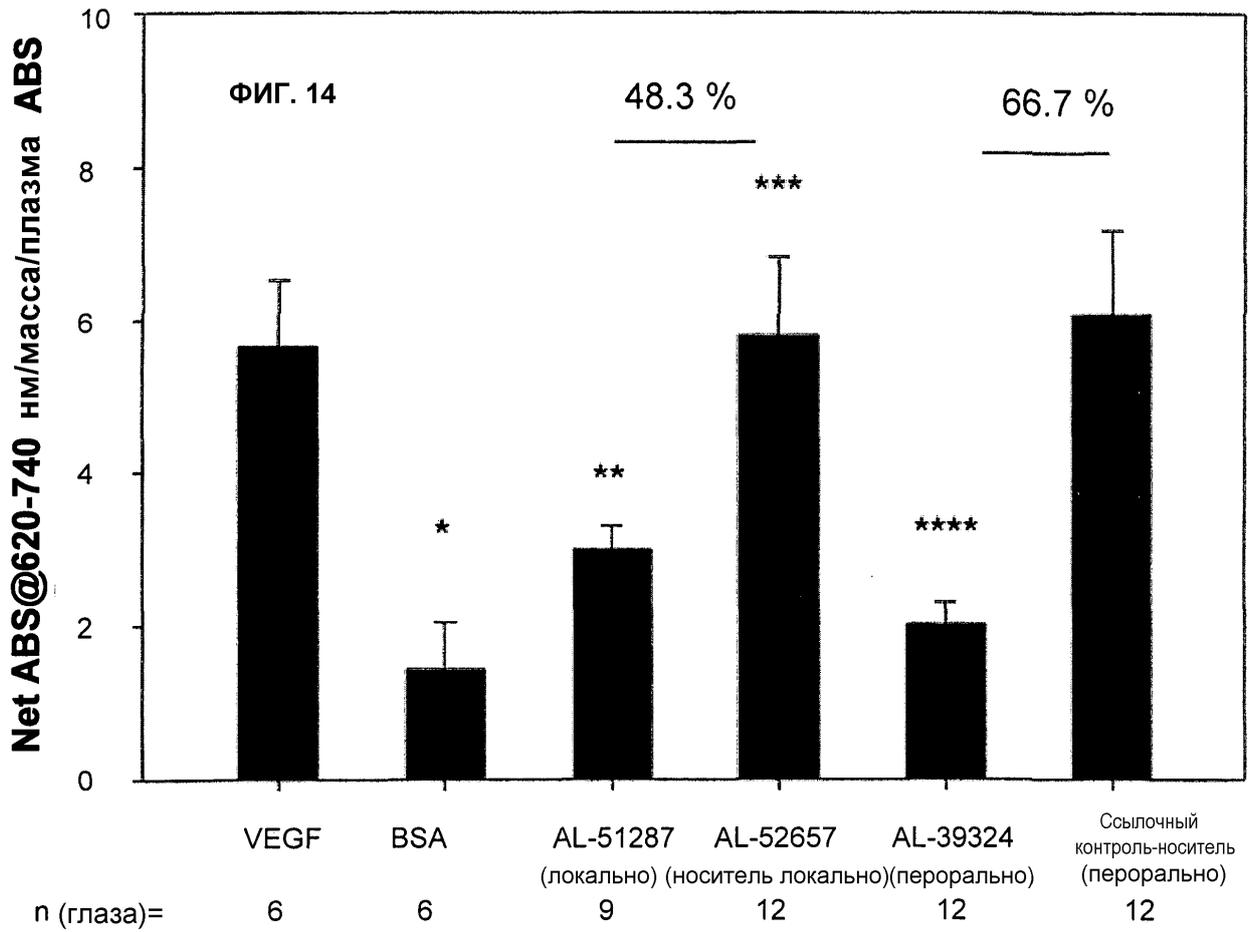
ФИГ. 12с



ФИГ. 13а

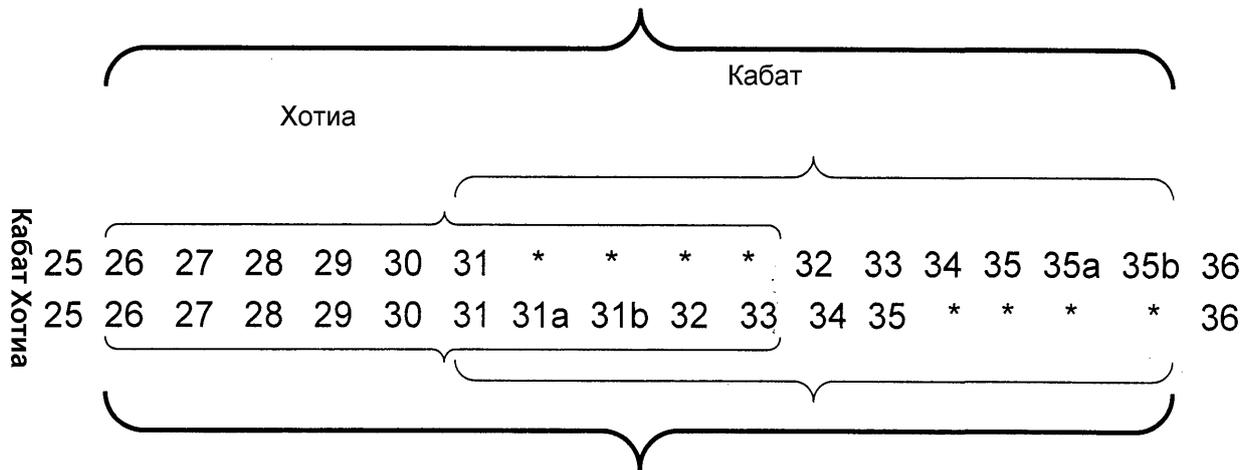


Группы обработки  
ФИГ. 13b



**ФИГ.14**

ESBATech's определение



**ФИГ. 15**