

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201301224** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2014.07.30**

(22) Дата подачи заявки  
**2008.03.31**

(51) Int. Cl. *C07K 16/18* (2006.01)  
*C07K 19/00* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*G01N 33/53* (2006.01)

---

(54) **НОВЫЙ АНТИГЕН, АССОЦИИРОВАННЫЙ С НОВООБРАЗОВАННЫМИ СОСУДАМИ  
ОПУХОЛЕВЫХ МЕТАСТАЗОВ**

---

(31) **60/909,580; 60/948,564**

(32) **2007.04.02; 2007.07.09**

(33) **US**

(62) **200970909; 2008.03.31**

(71) Заявитель:

**ФИЛОДЖЕН С.П.А. (IT)**

(72) Изобретатель:

**Нери Дарио, Рибак Яша, Роесли**

**Кристоф, Вилла Алессандра (CH),**

**Нери Джованни (IT)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Изобретение относится к связывающему элементу, который связывается с изоформой экстра-домена А (ED-A) фибронектина, для лечения опухолевых метастазов.

**A1**

**201301224**

**201301224**

**A1**

**НОВЫЙ АНТИГЕН, АССОЦИИРОВАННЫЙ С НОВООБРАЗОВАННЫМИ СОСУДАМИ  
ОПУХОЛЕВЫХ МЕТАСТАЗОВ**

ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к обнаружению и лечению метастазов, т.е. к обнаружению и лечению вторичных опухолей, возникающих в области, которая отдалена от участка расположения первичной опухоли. Данное изобретение включает применение связывающего элемента, который связывается с изоформой ED-A фибронектина, в частности, связывающего элемента, который связывается с ED-A фибронектина.

подавляющее большинство смертельных исходов при злокачественных опухолях связано с распространением метастазов при этом заболевании (Hanahan and Weinberg 2000), и стремительный процесс образования новых сосудов является характерным признаком образования агрессивных опухолевых метастазов.

Опухоли классифицируют либо как доброкачественные, либо как злокачественные. Злокачественные опухоли способны распространяться из области их первоначального возникновения (первичная опухоль) в другие части организма, тогда как доброкачественные опухоли не способны к подобному распространению. Злокачественные опухоли могут распространяться из области их первоначальной локализации путем инвазии и метастазирования. Опухоли, образованные в результате метастазирования, известны, например, как метастазы, вторичные опухоли, метастатические повреждения или очаги метастазирования.

Ангиогенез означает рост новых кровеносных сосудов из существующих кровеносных сосудов. Опухоли могут индуцировать ангиогенез путем секреции различных факторов роста (например, фактор роста сосудистого эндотелия). Опухолевый ангиогенез позволяет опухолям расти до размеров более нескольких миллиметров в диаметре, а также создает предпосылки к образованию опухолевых метастазов. Новые кровеносные сосуды,

образованные в результате ангиогенеза, образуют новую сосудистую систему опухоли или опухолевых метастазов.

Фибронектин (FN) является гликопротеином и широко экспрессируется во многих нормальных тканях и жидкостях организма. Он является компонентом внеклеточного матрикса (ECM) и играет важную роль во многих биологических процессах, включая клеточную адгезию, миграцию клеток, гемостаз, тромбоз, заживление ран, дифференцировку тканей и онкогенную трансформацию.

Различные изоформы фибронектина вырабатываются в результате альтернативного сплайсинга трех областей (ED-A, ED-B, IIICS) пре-мРНК первичного транскрипта фибронектина - процесса, который модулируется цитокинами и внеклеточным pH (Balza 1988; Carnemolla 1989; Borsi 1990; Borsi 1995). Фибронектин содержит два глобулярных экстра-домена III-типа, ED-A и ED-B, которые могут подвергаться альтернативному сплайсингу (French-Constant 1995, Hynes 1990, Kaspar et al. 2006). Домены ED-A фибронектина мыши и человека на 96,7% идентичны (между двумя аминокислотными последовательностями, состоящими из 90 аминокислот, отличие состоит только в 3 аминокислотах, см. фиг.5).

Экспрессия ED-A фибронектина была обнаружена в опухолевых клетках и в солидных опухолях на уровне мРНК (см., например, Jacobs et al. 2002, Matsumoto et al. 1999, Oyama et al. 1989, Tavian et al. 1994), на уровне изолированного белка (Borsi et al. 1987) и на иммуногистохимическом уровне (Borsi et al., 1998, Heikmheimo et al. 1991, Koukoulis et al. 1993, Koukoulis et al. 1995, Lohi et al. 1995, Scarpino et al. 1999). Кроме того, как было опубликовано Borsi et al., 1998, Exp Cell Res, 240, 244-251, ED-A присутствует в новообразованной кровеносной сети первичных опухолей. Однако никаких указаний на то, что ED-A ассоциирован с новообразованными сосудами опухолевых метастазов, прежде опубликовано не было.

В настоящем документе авторами изобретения показано, что ED-A фибронектина селективно экспрессируется на новообразованных сосудах опухолевых метастазов. Поскольку

опухолевые кровеносные сосуды легкодоступны для вводимых внутривенно терапевтических средств (Neri and Bicknell 2005, Rybak et al. 2006, Thorpe 2004, Trachsel and Neri 2006), связывающие молекулы, такие как молекулы антител, которые связываются с А-FN и/или ED-A фибронектина, представляют собой новые средства, которые могут быть использованы для получения лекарственного средства для лечения опухолевых метастазов и/или метастазирования опухолей. Терапия новообразованных сосудов опухоли (нацеливание на сосуды опухоли) является многообещающим подходом для лечения опухолевых метастазов. Под нацеливанием на сосуды опухоли подразумевается разрушение сосудов внутри самой опухоли, с уменьшением притока крови, чтобы ограничить приток кислорода и питательных веществ в опухоль, вызывая гибель опухолевых клеток.

В настоящем изобретении описаны анти-ED-A-антитела, которые селективно распознают вновь образованные кровеносные сосуды опухолевых метастазов.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению связывающего элемента, например, молекулы антитела, который связывается с изоформой экстра-домена А (ED-A) фибронектина (А-FN), для получения лекарственного средства для лечения опухолевых метастазов и/или метастазирования опухолей. В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению связывающего элемента, например, молекулы антитела, который связывается с ED-A фибронектина, для получения лекарственного средства для лечения опухолевых метастазов и/или метастазирования опухолей.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к применению связывающего элемента, например, молекулы антитела, который связывается с изоформой ED-A фибронектина, для доставки к новообразованной сосудистой сети опухолевых метастазов молекулы, конъюгированной со связывающим элементом. В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению связывающего элемента, например, молекулы антитела, который связывается с ED-A фибронектина, для доставки к новообразованной сосудистой сети опухолевых метастазов

молекулы, конъюгированной со связывающим элементом. В следующем аспекте связывающий элемент может быть использован для производства лекарственного средства для доставки такой молекулы.

Еще в одном аспекте изобретение относится к применению связывающего элемента, например, молекулы антитела, который связывается с изоформой ED-A фибронектина, для производства диагностического продукта для применения в диагностике опухолевых метастазов. Еще в одном следующем аспекте изобретение относится к применению связывающего элемента, например, молекулы антитела, который связывается с ED-A фибронектина, для производства диагностического продукта для применения в диагностике опухолевых метастазов.

Настоящее изобретение в одном аспекте относится к способу обнаружения или диагностирования опухолевых метастазов у человека или животного, включающему стадии:

(a) введения человеку или животному связывающего элемента, например, молекулы антитела, который связывается с изоформой ED-A фибронектина, и

(b) определения наличия или отсутствия связывающего элемента на участке, отдаленном от области, в настоящее время или прежде занятой первичной опухолью в организме человека или животного;

где локализация связывающего элемента на участке, отдаленном от области, в настоящее время или прежде занятой первичной опухолью в организме человека или животного, является указанием на наличие опухолевых метастазов.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу обнаружения или диагностирования опухолевых метастазов у человека или животного, включающему стадии:

(a) введения человеку или животному связывающего элемента, например, молекулы антитела, который связывается с ED-A фибронектина, и

(b) определения наличия или отсутствия связывающего элемента на участке, отдаленном от области, в настоящее время или прежде занятой первичной опухолью в организме человека или

животного;

где локализация связывающего элемента на участке, отдаленном от области, в настоящее время или прежде занятой первичной опухолью в организме человека или животного, является указанием на наличие опухолевых метастазов.

В одном аспекте настоящее изобретение относится также к способу лечения опухолевых метастазов у индивидуума, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества лекарственного средства, содержащего связывающий элемент, например, молекулу антитела, который связывается с изоформой ED-A фибронектина. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения опухолевых метастазов у индивидуума, включающему введение указанному индивидууму терапевтически эффективного количества лекарственного средства, содержащего связывающий элемент, например, молекулу антитела, который связывается с ED-A фибронектина.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу доставки молекулы в область вновь образованных сосудов опухолевых метастазов у человека или животного, предусматривающему введение указанному человеку или животному связывающего элемента, например, молекулы антитела, который связывается с изоформой ED-A фибронектина, где связывающий элемент конъюгирован с молекулой. В следующем аспекте изобретение относится к способу доставки молекулы в область вновь образованных сосудов опухолевых метастазов у человека или животного, предусматривающему введение указанному человеку или животному связывающего элемента, например, молекулы антитела, который связывается с ED-A фибронектина, где связывающий элемент конъюгирован с молекулой.

Связывающим элементом согласно изобретению может быть антитело, которое связывается с изоформой ED-A фибронектина и/или с ED-A фибронектина, включающее одну или более определяющих комплементарность областей (CDR) антитела H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 или G9 или их вариантов. Предпочтительно, чтобы связывающий элемент согласно изобретению представлял собой антитело, которое связывается с изоформой ED-

А фибронектина и/или с ED-A фибронектина, включающее одну или более определяющих комплементарность областей (CDR) антитела B2, C5, D5, C8, F8, B7 или G9 или их вариантов. Наиболее предпочтительно, чтобы связывающий элемент согласно изобретению представлял собой антитело, которое связывается с изоформой ED-A фибронектина и/или с ED-A фибронектина, включающее одну или более определяющих комплементарность областей (CDR) антитела F8 или их вариантов.

Связывающий элемент согласно изобретению может включать набор областей H- и/или L-CDR антитела H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 или G9, или набор областей H- и/или L-CDR антитела H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 или G9 с десятью или менее, например, одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью аминокислотными заменами внутри раскрытого в настоящем изобретении набора областей H- и/или L-CDR. Предпочтительно, чтобы связывающий элемент согласно изобретению содержал набор областей H- и/или L-CDR антитела B2, C5, D5, C8, F8, B7 или G9 с десятью или менее, например, одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью аминокислотными заменами внутри раскрытого в настоящем изобретении набора областей H- и/или L-CDR. Предпочтительно, чтобы связывающий элемент согласно изобретению содержал набор областей H- и/или L-CDR антитела F8 с десятью или менее, например, одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью аминокислотными заменами внутри раскрытого в настоящем изобретении набора областей H- и/или L-CDR.

Потенциально могут быть произведены замены любого остатка внутри набора областей CDR, и они могут быть произведены внутри областей CDR1, CDR2 и/или CDR3.

Например, как в настоящем изобретении описано, связывающий элемент согласно изобретению может включать одну или более областей CDR, например, CDR3, и, необязательно, также и CDR1 и CDR2, образуя набор областей CDR.

Связывающий элемент согласно изобретению может включать молекулу антитела, например, молекулу человеческого антитела. Связывающий элемент обычно содержит VH- и/или VL-домен антитела. VH-домены связывающих элементов также включены в

данное описание как часть настоящего изобретения. Внутри каждого из VH- и VL-доменов содержатся определяющие комплементарность области, ("CDR") и каркасные области, ("FR"). VH-домен содержит набор HCDR, а VL-домен содержит набор LCDR. Молекула антитела может включать VH-домен антитела, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 VH-области и каркасную область. Альтернативно или помимо этого, она может включать VL-домен антитела, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 VL-области и каркасную область. В настоящем изобретении описаны VH- и VL-домены и CDR-области антител H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 и G9. Все описанные в настоящем изобретении VH- и VL-последовательности, последовательности CDR, наборы CDR и наборы HCDR и наборы LCDR представляют собой аспекты и воплощения связывающего элемента для применения в настоящем изобретении. Как описано в настоящем документе, "набор CDR" включает CDR1, CDR2 и CDR3. Таким образом, набор CDR относится к HCDR1, HCDR2 и HCDR3, а набор LCDR относится к LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Если не указано иное, "набор CDR" включает области HCDR и LCDR.

Связывающий элемент согласно изобретению может содержать VH-домен антитела, включающий определяющие комплементарность области HCDR1, HCDR2 и HCDR3 и каркасную область, где HCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 3, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103 или 113, и где необязательно HCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 4 и/или HCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 5. Предпочтительно, чтобы HCDR1 представлял собой SEQ ID NO: 23, 33, 43, 53, 73, 83 или 103. Более предпочтительно, чтобы HCDR1 представлял собой SEQ ID NO: 83.

Обычно VH-домен спарен с VL-доменом, образуя антиген-связывающий участок антитела, хотя, как будет обсуждаться ниже, VH- или VL-домен может быть использован отдельно для связывания антитела. Таким образом, связывающий элемент согласно изобретению может дополнительно включать VL-домен антитела, включающий определяющие комплементарность области LCDP1, LCDR2 и LCDP3 и каркасную область, где LCDP1 представляет собой SEQ ID NO: 6, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106 или 116, и где необязательно LCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 7 и/или LCDR3



представляет собой SEQ ID NO: 8. Предпочтительно, когда LCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 26, 36, 46, 56, 76, 86 или 106. Наиболее предпочтительно, когда LCDP1 представляет собой SEQ ID NO: 86.

В одном из аспектов связывающий элемент согласно изобретению представляет собой изолированную молекулу антитела против ED-A-домена фибронектина, включающую VH-домен и VL-домен, где VH-домен содержит каркасную область и набор определяющих комплементарность областей HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и где VL-домен содержит определяющие комплементарность области LCDR1, LCDR2 и LCDR3 и каркасную область, и где

HCDR1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103 или 113,

HCDR2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4,

HCDR3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5,

LCDR1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106 или 116;

LCDR2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и

LCDR3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

Одна или более из областей CDR или набор областей CDR антитела могут быть привиты на каркасную область (например, каркасную область человека), с получением молекулы антитела для применения в данном изобретении. Каркасные области могут содержать последовательности генных сегментов человеческой зародышевой линии. Таким образом, каркасную область можно сделать приближенной к зародышевой линии, когда один или более остатков внутри каркасной области изменяют таким образом, чтобы они соответствовали остаткам в эквивалентном положении в наиболее схожей каркасной области человеческой зародышевой линии. Связывающий элемент согласно изобретению может быть изолированной молекулой антитела, имеющего VH-домен, содержащий набор HCDR-областей в каркасной области человеческой

зародышевой линии, например, DP47. Обычно связывающий элемент имеет также VL-домен, содержащий набор LCDR-областей, например, в каркасной области человеческой зародышевой линии. Каркасной областью человеческой зародышевой линии VL-домена может быть DPK22.

VH-домен согласно изобретению может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101 или 111. Предпочтительно, чтобы VH-домен согласно изобретению имел аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, 31, 41, 51, 71, 81 или 101. Наиболее предпочтительно, чтобы VH-домен согласно изобретению имел аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81. VL-домен согласно изобретению может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102 или 112. Предпочтительно, чтобы VL-домен согласно изобретению имел аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, 32, 42, 52, 72, 82 или 102. Наиболее предпочтительно, чтобы VL-домен согласно изобретению имел аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

Связывающий элемент согласно изобретению может быть одноцепочечным Fv (scFv), содержащим VH-домен и VL-домен, соединенные пептидным линкером. Специалисты могут выбрать соответствующую длину и последовательность линкера, например, линкер длиной по меньшей мере от 5 или 10 аминокислот до 15, 20 или 25 аминокислот. scFv может состоять из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9 или содержать эту последовательность.

Связывающий элемент согласно изобретению может представлять собой димерное антитело (WO 94/13804; Holliger 1993a), которое является молекулой, содержащей первый полипептид с VH-доменом и VL-доменом, соединенными пептидным линкером, и второй полипептид с VH-доменом и VL-доменом, соединенными пептидным линкером, где VH-домен и VL-домен первого полипептида спарен, соответственно, с VL-доменом и VH-доменом второго полипептида. Первый и второй полипептиды могут быть одинаковыми (когда спаривание приводит к образованию бивалентной молекулы) или разными (когда спаривание приводит к

образованию биспецифической молекулы). Специалисты могут выбрать соответствующую длину и последовательность линкера, например, линкер длиной в 5 или менее аминокислот. Линкер может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

Связывающий элемент согласно изобретению может содержать антиген-связывающий участок внутри молекулы, не являющейся антителом, обычно представленный одним или более CDR, например, набором CDR в каркасном белке, не являющемся антителом. Связывающие элементы, включая антительные и неантительные молекулы, более подробно описаны далее.

Связывающий элемент согласно изобретению может быть конъюгирован с молекулой, которая обладает биоцидной или цитотоксической активностью. Альтернативно, связывающий элемент согласно изобретению может быть конъюгирован с радиоизотопом. В качестве дополнительной альтернативы, связывающий элемент согласно изобретению может быть помечен детектируемой меткой.

Эти и другие аспекты настоящего изобретения более подробно описаны ниже.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

Фиг.1А: Приведено схематическое представление перфузии на основе методов протеомики, используемых для сравнительных анализов доступных белков в печени, полученной из организма здоровых мышей, и в печеночных метастазах F9, полученных из организма мышей. В: Показаны обширные метастатические очаги, развившиеся в печени в результате метастазирования опухоли F9. С: Показано селективное и эффективное окрашивание кровеносных сосудов печеночных метастазов F9 (Метастаз), а также сильное окрашивание кровеносных сосудов и включение метки некоторыми синусоидными капиллярами нормальной печени (Печень). Окрашивание соответствует более темным линиям, и оно получено после того как мышей-опухоленосителей перфузировали 15 мл 1,8 мМ раствора сульфосукцинимидил-6-[биотин-амидо]гексаноата (1 мг/мл) в PBS, pH 7,4, обогащенного 10% Декстраном-40 в качестве вещества, увеличивающего объем плазмы крови при терминальной анестезии, с последующим гистохимическим окрашиванием конъюгатом стрептавидина со щелочной фосфатазой.

Фиг.2А: На основе структуры фибронектиновых доменов показана локализация пептидов фибронектина, идентифицированных методами протеомики при анализе нормальной печени мышей (Норма) и печеночных метастазов F9 у мышей (Опухоль). В: Пептиды, идентифицированные методами протеомики при анализе нормальной печени мышей и печеночных метастазов F9 у мышей, подвергали экспериментам с использованием LC-MS/MS. Сначала пептиды разделяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, а затем элюировали, с получением 192 фракций. Аликвоту из каждой фракции наносили в виде отдельного пятна на планшет MALDI для автоматической идентификации мишеней, и для каждой фракции получали MALDI TOF MS-спектр. Показаны масс-спектры двух разных конкретных фракций ВЭЖХ (верхний ряд и средний ряд, соответственно) для трех параллельных проб мышинных печеночных метастазов F9 (см. панель, обозначенную как "Печеночные метастазы") и трех параллельных проб печени нормальных мышей (см. панель, обозначенную как "нормальная печень"). Высоты ионных пиков нормализованы по внутреннему стандарту (см. раздел Материалы и Методы), и это, таким образом, позволяет провести полу-количественное сравнение соответствующих пептидов в различных пробах. В верхнем ряду пик, на который указывает стрелка (обозначен "FU" в первой представленной пробе), соответствует пептиду FLTTTPNSLLVSWQAPR (SEQ ID NO: 15), который происходит из константной области фибронектина (фибронектиновый домен 16 типа III). Ионный пик этого пептида выше в пробах печеночных метастазов F9 у мышей (Печеночные метастазы), но он присутствует также и в образцах нормальной печени (Нормальная печень), указывая на то, что молекула фибронектина в принципе присутствует у мышей как в печеночных метастазах F9, так и в нормальной печени мышей, но в образцах печеночных метастазов F9 мышей она представлена в большем количестве. В среднем ряду пик, указанный правой стрелкой (обозначенный "EDA"), соответствует пептиду IAWESPQGQVSR (SEQ ID NO: 16), который происходит из фибронектинового экстра-домена А, образованного в результате альтернативного сплайсинга. Этот ED-A-пептид является единственным

детектируемым пептидом в образцах печеночных метастазов F9 у мышей (Печеночные метастазы) и отсутствует в образцах нормальной печени (Нормальная печень). Ссылочный пептид, указанный левой стрелкой (обозначен "ref"), был использован для идентификации фракции ВЭЖХ, в которую был элюирован пептид ED-A. Это означает, что наличие пика ссылочного пептида в спектрах, приведенных для образцов нормальной печени мышей (Нормальная печень), является доказательством того, что масс-спектры фракций, в которых пептид ED-A мог бы детектироваться, если бы он присутствовал в образцах нормальной печени мышей, представлены. Стрелка внизу указывает в масс-спектре на положение, в котором должен проявляться ионный пик пептида ED-A (указано стрелкой), демонстрируя отсутствие этого пептида в образцах нормальной печени.

Фиг.3А: Иммуногистохимическое окрашивание (более темные линии) печеночных метастазов F9 и прилежащей ткани нормальной мышинной печени flag-меченным родительским анти-ED-A-антителом (анти-ED-A) позволило выявить четкий рисунок (паттерн) окрашивания сосудов в метастазах, в то время как никакого специфического окрашивания в прилежащей ткани нормальной печени обнаружено не было. В отрицательном контроле (Контроль) flag-меченное родительское анти-ED-A-антитело не выявлялось. Рисунок окрашивания, наблюдаемый при использовании flag-меченного родительского анти-ED-A-антитела, подобен рисунку окрашивания, наблюдаемому в случае flag-меченного анти-ED-B scFv(L19) антитела (анти-EDB), которое распознает экстра-В-домен фибронектина, который является хорошо установленным маркером структур вновь образованных сосудов. В: Показаны органы (селезенка, сердце, легкое и часть печени, содержащая два метастаза) мышей Sv190, которым инъецировали опухолевые клетки F9DR, а еще через три недели дополнительно вводили в хвостовую вену (200 мкл/мышь, т.е. 60 мкг антитела/мышь) Alexa 750-меченное родительское анти-ED-A-антитело (в конечной концентрации 0,3 мг/мл). Мышинные органы извлекали через шесть часов после инъекции Alexa 750-меченного родительского анти-ED-A-антитела. Окрашивание Alexa 750-меченного родительского анти-

ED-A-антитела визуализировали с помощью самодельного инфракрасного флуоресцентного устройства для визуализации изображения (Birchler et al. 1999), снабженного вольфрамовой галогеновой лампой, фильтрами поглощения и испускания, специфичными для Alexa 750, и монохроматической CCD-камерой.

Фиг.4: Показана экспрессия ED-A в человеческих метастазах. Для иммуногистохимической оценки экспрессии ED-A в человеческих метастазах использовали flag-меченное родительское анти-ED-A-антитело. В то время как не наблюдалось никакого положительного окрашивания в отрицательных контрольных пробах (Контроль), в которых отсутствовал пик, соответствующий flag-меченному родительскому анти-ED-A-антителу, и лишь очень слабое фоновое окрашивание flag-меченным родительским анти-ED-A-антителом наблюдалось на срезах нормальной ткани легкого человека (Нормальная ткань легких), легочные метастазы (Человеческие легочные метастазы RCC [почечноклеточная карцинома]) строго положительно окрашивались flag-меченным родительским анти-ED-A-антителом (анти-EDA), как показано более темными линиями и тенями. Рисунок (паттерн) окрашивания flag-меченным родительским анти-ED-A-антителом носил в основном сосудистый характер и напоминал рисунок окрашивания, наблюдаемый в случае flag-меченого анти-ED-B scFv(L19) антитела (анти-EDB), которое распознает экстра-B-домен фибронектина, являющийся хорошо установленным маркером структур вновь образованных сосудов. Аналогичные результаты были получены при иммуногистохимическом анализе человеческих печеночных метастазов колоректальной карциномы (Человеческие печеночные метастазы CRC) с использованием flag-меченого родительского анти-ED-A-антитела. Flag-меченное родительское анти-ED-A-антитело позволило выявить строго сосудистый и стромальный характер окрашивания человеческих печеночных метастазов колоректальной карциномы.

Фиг.5: Показано выравнивание человеческого ED-A (верхняя последовательность) и мышино ED-A (нижняя последовательность). Звездочками указаны аминокислотные положения, в которых аминокислоты человеческого и мышино ED-A идентичны.

Фиг.6А: Приведена нуклеотидная последовательность тяжелой цепи (VH) анти-ED-A-антитела H1 (SEQ ID NO: 12). Нуклеотидная последовательность CDR1 тяжелой цепи анти-ED-A-антитела H1 подчеркнута. Нуклеотидная последовательность CDR2 тяжелой цепи анти-ED-A-антитела H1 выделена курсивом и подчеркнута. Нуклеотидная последовательность CDR3 тяжелой цепи анти-ED-A-антитела H1 выделена жирным шрифтом и подчеркнута. В: Приведена нуклеотидная последовательность линкерной последовательности (SEQ ID NO: 14) анти-ED-A-антитела H1. С: Приведена нуклеотидная последовательность легкой цепи (VL) (SEQ ID NO: 13) анти-ED-A-антитела H1. Нуклеотидная последовательность CDR1 легкой цепи анти-ED-A-антитела H1 подчеркнута. Нуклеотидная последовательность CDR2 легкой цепи анти-ED-A-антитела H1 выделена курсивом и подчеркнута. Нуклеотидная последовательность CDR3 легкой цепи анти-ED-A-антитела H1 выделена жирным шрифтом и подчеркнута.

Фиг.7А: Приведена аминокислотная последовательность тяжелой цепи (VH) анти-ED-A-антитела H1 (SEQ ID NO: 1). Аминокислотная последовательность CDR1 тяжелой цепи (SEQ ID NO: 3) анти-ED-A-антитела H1 подчеркнута. Аминокислотная последовательность CDR2 тяжелой цепи (SEQ ID NO: 4) анти-ED-A-антитела H1 выделена курсивом и подчеркнута. Аминокислотная последовательность CDR3 тяжелой цепи (SEQ ID NO: 5) анти-ED-A-антитела H1 выделена жирным шрифтом и подчеркнута. В: Приведена аминокислотная последовательность линкерной последовательности (SEQ ID NO: 11) анти-ED-A-антитела H1. С: Приведена аминокислотная последовательность легкой цепи (VL) (SEQ ID NO: 2) анти-ED-A-антитела H1. Аминокислотная последовательность CDR1 легкой цепи (SEQ ID NO: 6) анти-ED-A-антитела H1 подчеркнута. Аминокислотная последовательность CDR2 легкой цепи (SEQ ID NO: 7) анти-ED-A-антитела H1 выделена курсивом и подчеркнута. Аминокислотная последовательность CDR3 легкой цепи (SEQ ID NO: 8) анти-ED-A-антитела H1 выделена жирным шрифтом и подчеркнута.

Фиг.8: Показано биораспределение димерного антитела F8 у мышей-носителей опухоли F9. Четырех мышей-носителей опухоли

внутривенно инъецировали  $I^{125}$ -меченным димерным антителом F8. Через 24 часа мышей умерщвляли, и извлекали опухоль, печень, легкое, селезенку, сердце, почку, кишечник, хвост и кровь. Затем определяли радиоактивный счет в изъятых опухоли, печени, легком, селезенке, сердце, почке, кишечнике, хвосте и крови. На фиг.8 показан процент (%) инъецированной дозы (ID)  $I^{125}$ -меченного димерного антитела, детектируемый на грамм (г) опухоли, печени, легкого, селезенки, сердца, почки, кишечника, хвоста и крови. Опухоли F9 (опухоли) содержали приблизительно в четыре раза больше ID, чем любая из остальных подвергнутых анализу мышинных тканей.

### ТЕРМИНОЛОГИЯ

#### Фибронектин

Фибронектин является антигеном, подвергаемым альтернативному сплайсингу, и, как описано в настоящем изобретении, известен целый ряд альтернативных изоформ фибронектина. Экстра-домен А (EDA, или ED-A) известен также как ED, экстра-повтор А типа III (EIIIA), или EDI. Последовательность человеческого ED-A была опубликована Kornblihtt et al. (1984), *Nucleic Acids Res.* 12, 5853-5868 и Paolella et al. (1988), *Nucleic Acids Res.* 16, 3545-3557. Последовательность человеческого ED-A можно найти также в базе данных SwissProt как аминокислоты 1631-1720 (фибронектиновый домен 12 типа III; экстра-домен 2) аминокислотной последовательности, депонированной под регистрационным номером P02751. Последовательность мышинового ED-A можно найти в базе данных SwissProt как аминокислоты 1721-1810 (фибронектиновый домен 13 типа III; экстра-домен Z) аминокислотной последовательности, депонированной под регистрационным номером P11276.

Изоформа ED-A фибронектина (A-FN) содержит экстра-домен-А (ED-A). Последовательность человеческого A-FN может быть дедуктивно выведена из соответствующей последовательности предшественника фибронектина человека, которую можно найти в базе данных SwissProt под регистрационным номером P02751. Последовательность мышинового A-FN может быть дедуктивно выведена



из соответствующей последовательности предшественника мышинового фибронектина, которую можно найти в базе данных SwissProt под регистрационным номером P11276. А-FN может быть изоформой ED-A человеческого фибронектина. ED-A может быть экстра-доменом-A человеческого фибронектина.

ED-A является последовательностью, содержащей 90 аминокислот, которая встроена в фибронектин (FN) путем альтернативного сплайсинга и локализована между 11 и 12 доменами FN (Borsi et al., 1987, J. Cell Biol., 104, 595-600). ED-A в основном отсутствует в плазматической форме FN, но в избытке представлена в процессе эмбриогенеза, моделирования тканей, при фиброзе, трансплантации сердца и росте солидных опухолей.

#### Альтернативный сплайсинг

Альтернативный сплайсинг относится к появлению различных характеров сплайсинга первичного РНК-транскрипта ДНК для продуцирования различных мРНК. После исключения интронов путем селекции определяется то, какие экзоны будут подвергнуты сплайсингу друг с другом, образуя мРНК. Альтернативный сплайсинг приводит к образованию различных изоформ, содержащих разные экзоны и/или разное число экзонов. Например, одна изоформа может содержать дополнительную аминокислотную последовательность, соответствующую одному или более экзонам, которая может содержать один или более доменов.

#### Связывающий элемент

Этим термином обозначается один элемент из пары молекул, которые связываются друг с другом. Компоненты связанной пары могут быть получены природным путем или же могут быть полностью или частично синтезированы. Один компонент из этой пары молекул имеет на своей поверхности область, или полость, которая связывается и, следовательно, комплементарна особой пространственной и полярной организации другого компонента из этой пары молекул. Примерами таких связанных пар являются антиген-антитело, биотин-авидин, гормон-рецептор гормона, рецептор-лиганд, фермент-субстрат. Настоящее изобретение относится к реакциям типа антиген-антитело.

Связывающий элемент обычно содержит молекулу, имеющую антиген-связывающий участок. Например, связывающий элемент может быть молекулой антитела или не являющимся антителом белком, который имеет антиген-связывающий участок.

Антиген-связывающий участок может быть получен в результате аранжировки определяющих комплементарность областей (CDR) на каркасных структурах не являющегося антителом белка, такого как фибронектин или цитохром В и пр. (Naan & Maggos, 2004; Koide 1998; Nygren 1997), или путем рандомизации или мутации аминокислотных остатков петли внутри белкового каркаса для придания специфичности связывания с требуемой мишенью. Каркасные структуры для инженерии новых связывающих участков в белках подробно описаны Nygren et al. (1997). Каркасные структуры белков для имитации антител описаны в публикации WO/0034784, которая во всей полноте включена в настоящее описание в виде ссылки и в которой авторы этого изобретения описывают белки (имитаторы антител), которые включают фибронектиновый домен типа III, имеющий по меньшей мере одну рандомизированную петлю. Подходящую каркасную структуру, в которую можно встроить одну или более областей CDR, например, набор HCDR, можно обеспечить любым доменным элементом суперсемейства иммуноглобулиновых генов. Каркасной структурой может служить человеческий или не-человеческий белок. Преимуществом каркасной структуры неиммуноглобулинового белка является то, что она может обеспечить антиген-связывающий участок в каркасной структуре молекулы, которая меньше и/или которую произвести легче, чем по меньшей мере некоторые молекулы антител. Малый размер связывающего элемента может привести к полезным физиологическим свойствам, таким как способность проникать в клетки, глубоко проникать в ткани или достигать мишеней внутри других структур, или связываться внутри находящихся в белковой структуре полостей антигена-мишени. Применение антиген-связывающих участков в каркасных структурах белков, не являющихся антителом, рассмотрено в обзоре Wess, 2004. Типичными являются белки, имеющие стабильный остов и одну или более переменных петель, в которых

аминокислотная последовательность петли или петель претерпела специфические или случайные мутации для создания антиген-связывающего участка, который связывается с антигеном-мишенью. Такие белки включают IgG-связывающие домены белка А из *S. aureus*, трансферрина, тетранектина, фибронектина (например, 10-го домена фибронектина типа III) и липокалинов. Другие подходы включают "Микротельца" (Selecure GmbH), которые основаны на циклотидах - малых белках, имеющих внутримолекулярные дисульфидные связи.

Помимо последовательностей антител и/или антиген-связывающего участка, связывающий элемент согласно изобретению может включать другие аминокислоты, например, образующие пептид или полипептид, такой как складчатый домен, или придающие молекуле другие функциональные характеристики, помимо способности связываться с антигеном. Связывающие элементы согласно изобретению могут быть снабжены детектируемой меткой или могут быть конъюгированы с токсином или нацеливающим фрагментом или ферментом (например, через пептидилую связь или линкер). Например, связывающий элемент может включать каталитический участок (например, в ферментативном домене), а также антиген-связывающий участок, где антиген-связывающий участок связывается с антигеном и, таким образом, нацеливает, или направляет, каталитический центр на этот антиген. Каталитический центр может ингибировать биологическую функцию антигена, например, путем расщепления.

Несмотря на то, что, как было указано, участки CDR могут быть перенесены на не-антительные каркасные структуры, тем не менее структуры, несущие CDR или набор CDR согласно изобретению, обычно представляют собой последовательность тяжелой или легкой цепи или ее существенной части, в которой локализованы области CDR или набор CDR-областей, на участке, соответствующем CDR или набору CDR природных переменных VH- и VL-доменов антитела, кодируемого иммуноглобулиновыми генами, претерпевшими реаранжировку. Структуры и места локализации иммуноглобулиновых переменных доменов могут быть определены согласно Kabat 1987, с обновлениями этой ссылки, которые в

настоящее время доступны в Интернете (по адресу [immuno.bme.nwu.edu](http://immuno.bme.nwu.edu) или по ключевому слову "Kabat" в любой поисковой системе).

Под областью CDR или CDR, подразумеваются гипервариабельные области тяжелой или легкой цепей иммуноглобулина, как определено у Kabat et al. (1987), (Kabat, 1991a, а также более поздние издания). Обычно антитело содержит 3 области CDR тяжелой цепи и 3 области CDR легкой цепи. Термин область CDR или области CDR используется в настоящем изобретении для указания, в зависимости от конкретного случая, на одну, несколько или даже на все из этих областей, которые содержат основную часть аминокислотных остатков, ответственных за аффинность связывания антитела с антигеном или с эпитопом, которые оно распознает. Среди шести коротких последовательностей CDR третья область CDR тяжелой цепи (HCDR3) имеет больший уровень вариабельности (большую степень разнообразия, в основном за счет механизмов арранжировки генов, которые тому способствуют). Она может иметь в длину всего 2 аминокислоты, при этом наибольшая из известных длин этой области составляет 26. Функционально HCDR3 отчасти играет роль в определении специфичности антитела (Segal 1974; Amit 1986; Chothia 1987; Chothia 1989; Caton 1990; Sharon 1990a; Sharon 1990b; Kabat et al., 1991b).

#### Молекула антитела

Это относится к иммуноглобулину, полученному природным путем или продуцируемому частично или полностью синтетическим путем. Этот термин охватывает также любой полипептид или белок, содержащий антиген-связывающий участок антитела. В настоящем изобретении следует иметь в виду, что настоящее изобретение не относится к антителам в природной форме, т.е. подразумевается, что они не находятся в своем природном окружении, но что они могут быть выделены или получены путем очистки из природных источников, или же они могут быть получены путем генетической рекомбинации или путем химического синтеза, и что поэтому они, как будет описано далее, могут содержать неприродные аминокислоты. Фрагменты антитела, которые содержат антиген-

связывающий участок антитела, включают, не ограничиваясь перечисленным, такие молекулы антитела как Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb, Fd; и димерные антитела.

Можно взять моноклональные и другие антитела и использовать технологию рекомбинантных ДНК для получения других антител или химерных молекул, которые связываются с антигеном-мишенью. Такие технологии могут включать введение ДНК, кодирующей переменную область иммуноглобулина, или область CDR антитела, в константные области или в константные области плюс каркасные области, другого иммуноглобулина. См., например, EP-A-184187, GB 2188638A или EP-A-239400 и обширный список литературы, связанной с этими ссылками. Гибридома или другая клетка, продуцирующая антитело, может быть подвергнута генетической мутации или другим изменениям, которые могут изменить, а могут и не изменять специфичность связывания продуцируемых антител.

Поскольку антитела могут быть модифицированы целым рядом различных путей, термин "молекула антитела" должен быть истолкован как охватывающий любой связывающий элемент или вещество, имеющее антиген-связывающий участок антитела с требуемой специфичностью и/или связыванием с антигеном. Таким образом, этот термин распространяется на фрагменты антитела и его производные, включая любой полипептид, содержащий антиген-связывающий участок антитела, будь он природным или же полностью или частично синтезированным. Следовательно, в это понятие включены также химерные молекулы, содержащие антиген-связывающий участок антитела или его эквивалент, слитый с другим полипептидом (например, полученным из организма другого вида или принадлежащим другому классу или подклассу антител). Клонирование и экспрессия химерных антител описаны в EP-A-0120694 и EP-A-0125023, а также в обширном списке литературы, связанной с этими ссылками.

Новые технологии, известные в области инженерии антител, позволяют изолировать человеческие и гуманизированные антитела. Например, человеческие гибридомы могут быть получены, как описано Kontermann & Dubel (2001). Фаговый дисплей, другая

установившаяся технология для получения связывающих элементов, подробно описана во многих публикациях, таких как WO 92/01047 (дополнительно обсуждается ниже) и патентах США US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160, US6521404, а также Kontermann & Dubel (2001). Трансгенные мыши, у которых гены мышинового антитела инактивированы и функционально заменены генами человеческого антитела, а остальные компоненты иммунной системы остались при этом интактными, могут быть использованы для выделения человеческих антител (Mendez 1997).

Синтетические молекулы антител могут быть созданы путем экспрессии из генов, полученных на основе олигонуклеотидов, синтезированных и сконструированных внутри соответствующих экспрессирующих векторов, например, как описано Knappik et al. (2000) или Krebs et al. (2001).

Показано, что фрагменты целого антитела могут выполнять функцию связывания антигенов. Примерами связывающих фрагментов являются (i) Fab-фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iii) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одноцепочечного антитела; (iv) dAb-фрагмент (Ward 1989; McCafferty 1990; Holt 2003), который состоит из VH- или VL-домена; (v) изолированные области CDR; (vi) F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, бивалентный фрагмент, содержащий два связанных Fab-фрагмента; (vii) одноцепочечные Fv-молекулы (scFv), в которых VH-домен и VL-домен связаны пептидным линкером, который позволяет двум доменам ассоциировать друг с другом, с образованием антиген-связывающего участка (Bird 1988; Huston 1988); (viii) биспецифические одноцепочечные Fv-димеры (PCT/US92/09965) и (ix) "димерные антитела", мультивалентные или мультиспецифические фрагменты, полученные путем слияния генов (WO 94/13804; Holliger 1993a). Молекулы Fv, scFv или димерных антител могут быть стабилизированы путем встраивания дисульфидных мостиков, связывающих VH- и VL-домены (Peiter 1996). Могут быть получены также минитела, содержащие scFv,

соединенный с CH3-доменом (Hu 1996). Другими примерами связывающих фрагментов являются Fab', который отличается от Fab-фрагментов добавлением нескольких остатков на карбокси-конце CH1-домена тяжелой цепи, включая один или более цистеинов из шарнирной части антитела, и Fab'-SH, который представляет собой Fab'-фрагмент, в котором цистеиновый остаток (остатки) константного домена несет свободную тиоловую группу.

Фрагменты антитела согласно изобретению могут быть получены, начиная с любой из описанных в настоящем изобретении молекул антитела, например, молекул антитела, содержащих VH-и/или VL-домены или области CDR любого из описанных в настоящем изобретении антител, такими методами как переваривание ферментами, такими как пепсин или папаин, и/или расщепление дисульфидных мостиков путем химического восстановления. Иным способом фрагменты антитела согласно изобретению могут быть получены с использованием технологии генетической рекомбинации, также хорошо известной специалистам в данной области, или еще путем пептидного синтеза, например, с использованием автоматических пептидных синтезаторов, таких как поставляемые компанией Applied Biosystems, и т.д., или путем синтеза и экспрессии нуклеиновой кислоты.

Функциональные фрагменты антитела согласно изобретению включают любой функциональный фрагмент, время полужизни которого увеличено в результате химической модификации, в частности, путем ПЭГилирования или путем встраивания в липосому.

dAb (домен антитела) представляет собой малый мономерный антиген-связывающий фрагмент антитела, а именно, переменную область тяжелой или легкой цепи антитела (Holt 2003). VH-dAb-фрагменты природным путем возникают у верблюдов (например, верблюд, лама) и могут быть получены у верблюда путем иммунизации антигеном-мишенью, выделения антиген-специфических В-клеток и прямого клонирования dAb-генов из индивидуальных В-клеток. dAb-домены можно получить также в клеточной культуре. Их малый размер, хорошая растворимость и термостабильность делает их физиологически чрезвычайно эффективными и подходящими

для селекции и созревания аффинности. Связывающим элементом согласно изобретению может быть dAb, содержащий VH- или VL-домен, по существу, такой, как в настоящем изобретении описано, или VH- или VL-домен, содержащий набор CDR, по существу, такой, как в настоящем изобретении описано.

В настоящем изобретении фраза "по существу, такой, как описано", относится к характеристике(ам) соответствующих областей CDR VH- или VL-домена описанных в настоящем изобретении связывающих элементов, которые либо идентичны, либо очень схожи со строго определенными областями, последовательность которых в настоящем изобретении описана. Под фразой "очень схожи" в отношении строго определенной области (областей) одного или более переменных доменов в настоящем изобретении подразумевается, что от 1 приблизительно до 5, например, от 1 до 4, включая 1-3, или 1 или 2, или 3, или 4 аминокислотных замены может быть произведено в области CDR и/или в VH- или VL-домене.

Биспецифические или бифункциональные антитела образуют второе поколение моноклональных антител, в которых две различных переменные области скомбинированы в составе одной и той же молекулы (Holliger 1999). Их применение продемонстрировано как в диагностической области, так и в терапии, от их способности выполнять новые эффекторные функции до нацеливания на несколько молекул на поверхности опухолевых клеток. Где бы ни использовались биспецифические антитела, они могут быть серийными биспецифическими антителами, которые можно производить различными путями (Holliger 1993b), например, получать химическим путем или из гибридом, или же они могут быть любыми из описанных в настоящем изобретении биспецифических фрагментов антитела. Эти антитела могут быть получены химическими методами (Glennie 1987; Repp 1995) или соматическими методами (Staerz 1986; Suresh 1986), но подобными технологиям геной инженерии, которые позволяют производить гетеродимеризацию и, таким образом, облегчают процесс очистки искомого антитела (Merchand 1998). Примеры биспецифических антител включают такие антитела согласно технологии BiTE™, в



которых могут быть использованы связывающие домены двух антител с различной специфичностью, напрямую связанные короткими гибкими пептидами. Это позволяет комбинировать два антитела на короткой одинарной полипептидной цепи. Димерного антитела и scFv могут быть сконструированы без Fc-области, только с использованием переменных доменов, что потенциально снижает эффекты анти-идиотипической реакции.

Биспецифические антитела могут быть сконструированы в виде полноразмерного IgG, в виде биспецифического Fab'2, в виде Fab'-ПЭГ, в виде димерных антител или еще в виде биспецифического scFv. Кроме того, два специфических антитела могут быть связаны с помощью рутинных методов, известных в данной области, с образованием тетравалентных антител.

Биспецифические димерные антитела, в отличие от биспецифических полноразмерных антител, также могут представлять особую ценность, поскольку их легко можно сконструировать и экспрессировать в *E.coli*. Димерные антитела (и многие другие полипептиды, такие как фрагменты антител) с соответствующей специфичностью связывания легко можно подвергнуть селекции с использованием фагового дисплея из библиотек (WO 94/13804). Если одно плечо димерного антитела надо поддерживать в неизменном состоянии, например, со специфичностью против антигена-мишени, тогда можно создать библиотеку, в которой другое плечо варьирует, и отобрать антитело с соответствующей специфичностью. Биспецифические полноразмерные антитела могут быть получены с использованием методов альтернативной инженерии, как описано у Ridgeway 1996.

В данной области существуют различные способы получения антител против антигена-мишени. Антитела могут быть моноклональными антителами, в частности, человеческой, мышинной, химерной или гуманизированной природы, которые могут быть получены в соответствии со стандартными методами, хорошо известными специалистам в данной области.

Обычно для получения моноклональных антител или их функциональных фрагментов, особенно мышинной природы, можно воспользоваться технологией, которая описана, в частности, в

руководстве "Antibodies" (Harlow and Lane 1988), или технологией их получения из гибридом, описанной Kohler и Milstem, 1975.

Моноклональные антитела могут быть получены, например, из клеток животных, иммунизированных А-FN или одним из его фрагментов, содержащих эпитоп, распознаваемый указанными моноклональными антителами, например, фрагментом, содержащим или состоящим из ED-A, или пептидным фрагментом ED-A. А-FN или один из его фрагментов может быть получен, в частности, в соответствии с обычно используемыми методами, путем генетической рекомбинации, начиная с последовательности нуклеиновой кислоты, содержащейся в последовательности кДНК, кодирующей А-FN или его фрагмент, путем пептидного синтеза, начиная с аминокислотной последовательности, содержащейся в пептидной последовательности А-FN и/или его фрагмента.

Моноклональные антитела могут быть очищены, например, на колонке для аффинной хроматографии, на которой ранее был иммобилизован А-FN или один из его фрагментов, содержащих эпитоп, распознаваемый указанными моноклональными антителами, например, фрагмент, содержащий ED-A или состоящий из него, или пептидный фрагмент ED-A. Моноклональные антитела могут быть очищены путем хроматографии на колонке с белком А и/или G, необязательно с последующей ионообменной хроматографией с целью удаления остаточных белковых примесей, а также примесей ДНК и ЛПС как таковых, необязательно с последующей эксклюзионной хроматографией на сефарозном геле с целью удаления потенциальных агрегатов за счет наличия димеров или других мультимеров. В совокупности эти технологии могут быть использованы одновременно или последовательно.

#### Антиген-связывающий участок

Это относится к части молекулы, которая связывается и комплементарна полному антигену-мишени или его части. В молекуле антитела она называется антиген-связывающим участком и включает часть антитела, которая связывается и комплементарна полному антигену-мишени или его части. Когда антиген большой, антитело может связываться только с особой частью антигена,

которая называется эпитопом. Антиген-связывающая часть антитела может быть обусловлена одним или более переменными доменами антитела. Антиген-связывающая часть антитела может содержать переменную область легкой цепи (VL) антитела и переменную область тяжелой цепи (VH) антитела.

#### Изолирование

Это относится к состоянию, в котором, в соответствии с настоящим изобретением, будут обычно находиться связывающие элементы согласно изобретению или нуклеиновая кислота, кодирующая такие связывающие элементы. Таким образом, связывающие элементы, VH- и/или VL-домены согласно изобретению могут быть представлены в изолированной и/или очищенной, например, от их природного окружения, по существу чистой или гомогенной, формах, или, в случае нуклеиновой кислоты, в форме, свободной или по существу свободной от нуклеиновой кислоты или генов иной природы, нежели последовательность, кодирующая полипептид с требуемой функцией. Изолированные элементы и изолированная нуклеиновая кислота будут свободны или по существу свободны от материала, с которым они ассоциированы в природе, такого как другие полипептиды или нуклеиновые кислоты, с которыми они обнаруживаются в их природном окружении, или в среде, в которой их получают (например, клеточная культура), когда такое получение представляет собой технологию рекомбинантных ДНК, практикуемую *in vitro* или *in vivo*. Элементы и нуклеиновая кислота могут быть получены в составе с разбавителями или адъювантами, и для практических же целей их будут смешивать с желатином или другими носителями при использовании для покрытия микротитровальных планшетов для применения в иммуноанализе или смешивать с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями при использовании в диагностике или терапии. Связывающие элементы могут быть гликозилированы либо природным путем, либо в системе гетерологических эукариотических клеток (например, CHO или NSO (ECACC 85110503), или же они могут быть негликозилированы (например, если они получены путем экспрессии в прокариотической клетке).

Гетерогенные препараты, содержащие молекулы антитела, также составляют часть настоящего изобретения. Например, такими препаратами могут быть смеси антител с полноразмерными тяжелыми цепями и тяжелые цепи, лишенные С-концевого лизина, с различными уровнями гликозилирования и/или с дериватизированными аминокислотами, например, циклизация N-концевой глутаминовой кислоты с образованием остатка пироглутаминовой кислоты.

Один или более связывающих элементов в отношении антигена, например, A-FN- или ED-A-фибронектина, могут быть получены путем приведения библиотеки связывающих элементов согласно изобретению в контакт с антигеном или его фрагментом, например, фрагментом, содержащим или состоящим из ED-A или пептидного фрагмента ED-A, и селекции одного или более связывающих элементов библиотеки, способных связываться с антигеном.

Библиотека антител может быть подвергнута скринингу методом ICFS. При ICFS бактерии, содержащие ДНК, кодирующую несколько специфичностей связывания, выращивают в жидкой среде, и сразу по достижении стадии экспоненциального роста несколько миллиардов бактерий наносят на ростовую основу, состоящую из предварительно обработанного соответствующим образом мембранного фильтра, который инкубируют до тех пор, пока бактериальные колонии не достигнут состояния полного конfluence. Второй задерживающий субстрат состоит из другого мембранного фильтра, предварительно увлажненного и покрытого требуемым антигеном.

Затем задерживающий мембранный фильтр помещают на планшет, содержащий соответствующую культуральную среду, и покрывают ростовым фильтром, наружная поверхность которого покрыта бактериальными колониями. Полученный таким образом сэндвич инкубируют приблизительно 16 ч. Таким образом можно обеспечить экспрессию генов, кодирующих фрагменты scFv антител широкого действия, при этом те фрагменты, которые специфически связываются с антигеном, который присутствует на задерживающем мембранном фильтре, удерживаются на этом фильтре. Затем задерживающую мембрану обрабатывают, чтобы выделить фрагменты

scFv антител, используя для этого общепринятые методы колориметрии.

Положение окрашенных пятен на задерживающем фильтре позволяет вернуться назад к соответствующим бактериальными колониям, которые присутствуют на ростовой мембране и которые являются продуцентами задержанных фрагментов антител. Такие колонии собирают и выращивают, и несколько миллионов бактерий наносят на новую культуральную мембрану фильтра, повторно производя описанные выше процедуры. Затем аналогичные циклы выполняют до тех пор, пока положительные сигналы на задерживающей мембране положительным колониям единственного типа, каждая из которых представляет собой потенциальный источник фрагментов моноклонального антитела против антигена, который был использован при селекции. Метод ICFS описан, например, в заявке WO 0246455, которая включена в настоящее описание в виде ссылки. Библиотеку можно также разделить на частицы или молекулярные комплексы, например, на репликативные генетические блоки из частиц таких бактериофагов (например, T7), или другие визуализированные системы *in vitro*, где каждая частица или молекулярный комплекс содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую переменный VH-домен обнаруживаемого на них антитела, а также, необязательно, VL-домен, если он присутствует. Метод фагового дисплея описан в заявке WO 92/01047 и, например, в патентах США US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160 и US6521404, каждый из которых во всей полноте включен в настоящее описание в виде ссылки.

После селекции связывающих элементов, способных связываться с данным антигеном и представленных на бактериофаге или других частицах или молекулярных комплексах библиотеки, нуклеиновую кислоту можно получить из бактериофага или другой частицы или молекулярного комплекса, на которых представлен указанный связывающий элемент. Такая нуклеиновая кислота может быть использована в последующем продуцировании связывающего элемента или переменного VH- или VL-домена антитела путем

экспрессии с нуклеиновой кислоты с последовательностью нуклеиновой кислоты, взятой из бактериофага или другой частицы или молекулярного комплекса, на которых представлен указанный связывающий элемент.

Вариабельный VH-домен антитела с аминокислотной последовательностью вариабельного VH-домена антитела указанного селективного связывающего элемента может быть получен как в изолированной форме, так и в виде связывающего элемента, содержащего такой VH-домен.

Способность связываться с фибронектиновым A-FN или ED-A или с другими антигенами- или изоформами-мишенями можно проверить дополнительно, например, их способность конкурировать, например, с любым из анти-ED-A-антител H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 или G9 в отношении связывания A-FN или фрагмента A-FN, например, ED-A фибронектина.

Связывающий элемент согласно изобретению может специфически связываться с A-FN и/или ED-A фибронектина. Связывающий элемент согласно изобретению может связываться с A-FN и/или ED-A фибронектина с той же самой аффинностью, что и анти-ED-A-антитело H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 или G9, например, в формате scFv, или с еще более высокой аффинностью. Связывающий элемент согласно изобретению может специфически связываться с A-FN и/или ED-A фибронектина с  $K_D$ , составляющей  $3 \times 10^{-8}$  М, или с еще более высокой аффинностью. Предпочтительно, чтобы связывающий элемент согласно изобретению связывался с A-FN и/или ED-A фибронектина с  $K_D$ , составляющей  $2 \times 10^{-8}$  М, или с еще более высокой аффинностью. Более предпочтительно, чтобы связывающий элемент согласно изобретению связывался с A-FN и/или ED-A фибронектина с  $K_D$ , составляющей  $1,7 \times 10^{-8}$  М, или с еще более высокой аффинностью. Еще более предпочтительно, чтобы связывающий элемент согласно изобретению связывался с A-FN и/или ED-A фибронектина с  $K_D$ , составляющей  $1,4 \times 10^{-8}$  М, или с еще более высокой аффинностью. Наиболее предпочтительно, чтобы связывающий элемент согласно изобретению связывался с A-FN и/или ED-A фибронектина с  $K_D$ , составляющей

$3 \times 10^{-9}$  M, или с еще более высокой аффинностью.

Связывающий элемент согласно изобретению может связываться с тем же самым эпитопом на A-FN и/или ED-A фибронектина, что и анти-ED-A-антитело H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 или G9.

Связывающий элемент согласно изобретению может не проявлять какого-либо существенного связывания с молекулами, отличными от A-FN и/или ED-A фибронектина. В частности, связывающий элемент может не связываться с другими изоформами фибронектина, например, изоформой ED-B и/или изоформой IIICS фибронектина.

Описанные в настоящем изобретении варианты молекул антитела могут быть продуцированы и использованы в рамках настоящего изобретения. Такие технологии требуют реализации замен внутри аминокислотных последовательностей CDR, VH- или VL-доменов антител и связывающих элементов, обычно доступных в данной области. Могут быть получены варианты последовательностей с заменами, которые, согласно предсказаниям, могут оказывать, а могут и не оказывать минимальное или благотворное влияние на активность, и могут быть тестированы на предмет их способности связываться с A-FN и/или ED-A фибронектина и/или в отношении какого-либо иного требуемого от них свойства.

Варианты аминокислотной последовательности вариабельного домена любого из VH- и VL-доменов, последовательности которых описаны в настоящем изобретении специально, могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, как было сказано выше. Конкретные варианты могут включать одно или более изменений в последовательностях аминокислотных остатков (добавление, делецию, замену и/или вставку аминокислотного остатка), могут иметь менее чем примерно 20 изменений, менее чем примерно 15 изменений, менее чем примерно 10 изменений, менее чем примерно 5 изменений, возможно, 5, 4, 3, 2 или 1. Изменения могут быть произведены в одной или более каркасных областях и/или в одной или более областях CDR. Обычно изменения

не приводят к потере функции, так что связывающий элемент, содержащий измененную таким образом аминокислотную последовательность, может сохранить способность связываться с А-FN и/или ED-A фибронектина. Например, он может сохранить в количественном отношении такое же связывание, что и связывающий элемент, в котором не произведено модификаций, например, как показано на основании измерений в описанном в настоящем изобретении анализе. Связывающий элемент, содержащий измененную таким образом аминокислотную последовательность, может обладать улучшенной способностью связываться с А-FN и/или ED-A фибронектина.

Новые VH- или VL-области, несущие полученные из CDR последовательности согласно изобретению, могут быть получены с использованием случайного мутагенеза одного или более выбранных VH- и/или VL-генов, чтобы вызвать мутации внутри полного переменного домена. В некоторых воплощениях внутри полного переменного домена или набора CDR производят одну или две аминокислотных замены. Другой способ, который может быть использован, связан с тем, чтобы направить мутагенез на CDR-области VH- или VL-генов.

Как указано выше, аминокислотная последовательность CDR, по существу, как в настоящем изобретении указано, может встречаться в виде CDR в переменном домене антитела человека или его существенной части. HCDR3-последовательности, по существу, как в настоящем изобретении указано, представляют собой воплощения настоящего изобретения и, например, каждый из них может содержаться в HCDR3 в переменном домене антитела человека или существенной его части.

Переменные домены, используемые в настоящем изобретении, могут быть получены или произведены из любой зародышевой линии или в результате реаранжировки человеческого переменного домена, или же могут быть синтетическим переменным доменом на основе консенсусных или истинных последовательностей известных человеческих переменных доменов. Переменный домен может быть произведен из не-человеческого антитела. CDR-последовательность согласно изобретению (например, CDR3) может



быть введена в репертуар переменных доменов, лишенных CDR (например, CDR3), с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Например, у Marks et al. (1992) описаны способы продуцирования репертуаров переменных доменов антитела, в которых консенсусные праймеры, направленные на 5'-конец или на соседнюю с 5'-концом область переменного домена, используются в сочетании с консенсусными праймерами для третьей каркасной области человеческих VH-генов, чтобы обеспечить репертуар переменных VH-доменов, лишенных CDR3. Marks и др. дополнительно описали то, как этот репертуар можно скомбинировать с CDR3 конкретного антитела. С помощью аналогичной технологии последовательности согласно изобретению, произведенные из области CDR3, могут быть смешаны (перетасованы) с репертуаром VH- или VL-доменов, лишенных CDR3, а смешанные полные VH- или VL-домены скомбинированы с родственным VH- или VL-доменом, с получением связывающих элементов согласно изобретению. Затем этот репертуар может быть воспроизведен в соответствующей системе хозяина, так, чтобы система фагового дисплея согласно международной заявке WO 92/01047, которая во всей полноте включена в настоящее описание в виде ссылки, или последующему обширному списку литературы, включая Kay, Winter & McCafferty (1996), с тем, чтобы можно было произвести селекцию связывающих элементов. Репертуар может насчитывать количество, приблизительно составляющее от  $10^4$  индивидуальных связывающих элементов до, например, по меньшей мере  $10^5$ , по меньшей мере  $10^6$ , по меньшей мере  $10^7$ , по меньшей мере  $10^8$ , по меньшей мере  $10^9$  или по меньшей мере  $10^{10}$ .

Сходным образом, можно перенести одну или более, или же все три области CDR в репертуар VH- или VL-доменов, а затем подвергнуть их скринингу на предмет селекции связывающего элемента или связывающих элементов в отношении A-FN и/или ED-A фибронектина.

Можно использовать одну или более из областей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 антитела H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 или G9, или набора областей HCDR, и/или можно использовать одну или более из областей LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антитела H1, B2, C5, D5,

E5, C8, F8, F1, B7, E8 или G9, или набора областей HCDR антитела H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 или G9.

Сходным образом, можно использовать другие описанные в настоящем изобретении VH- и VL-домены, наборы CDR и наборы HCDR и/или наборы LCDR.

A-FN и/или ED-A фибронектина можно использовать в скрининге на предмет селекции связывающих элементов, например, молекул антитела, для применения в получении лекарственного средства для лечения опухолевых метастазов. Как указано в настоящем изобретении, можно осуществлять также скрининг репертуара.

В некоторых воплощениях существенная часть переменного домена иммуноглобулина будет включать по меньшей мере все три области CDR вместе с находящимися между ними каркасными областями. Указанная часть может включать также по меньшей мере приблизительно 50% каждой или обеих из первой и четвертой каркасных областей, при этом эти 50% составляют 50% С-концевой первой каркасной области и 50% N-концевой области четвертой каркасной области. Дополнительными остатками в N-концевой или С-концевой области существенной части переменного домена могут быть те остатки, которые аномально ассоциированы с природно возникающими областями переменного домена. Например, конструирование связывающих элементов согласно изобретению, осуществляемое методами рекомбинантных ДНК, может приводить к введению N- или С-концевых остатков, кодируемых линкерами, вводимыми для облегчения клонирования или других манипуляционных стадий. Другие манипуляционные стадии включают введение линкеров для соединения переменных доменов согласно изобретению с дополнительными белковыми последовательностями, включая константные области антитела, другие переменные домены (например, при продуцировании димерных антител) или детектируемые/функциональные метки, что в настоящем описании можно найти в более подробном изложении.

Хотя в некоторых аспектах настоящего изобретения связывающие элементы и содержат пару VH- и VL-доменов, одиночные связывающие домены на основе последовательностей либо

VH-, либо VL-доменов образуют дальнейшие аспекты настоящего изобретения. Известно, что одиночные иммуноглобулиновые домены, в частности, VH-домены, способны специфическим образом связывать антигены-мишени. Например, см. выше обсуждение dAb-доменов.

В случае любого из одиночных связывающих доменов эти домены могут быть использованы для скрининга комплементарных доменов, способных образовывать двухдоменный связывающий элемент, способный связываться с А-FN и/или ED-A фибронектина. Это может быть достигнуто с помощью методов скрининга фагового дисплея с применением так называемого иерархического двуединого комбинаторного подхода, как описано в документе WO 92/01047, во всей полноте включенном в настоящее описание в виде ссылки, в котором индивидуальная колония, содержащая клон либо H-, либо L-цепи, используется для инфицирования полной библиотеки клонов, кодирующих другую цепь (L или H), и полученный в результате двухцепочечный связывающий элемент отбирают в соответствии с технологией фагового дисплея, той, что описана в данной ссылке. Эта технология описана также и у Marks, 1992.

Связывающие элементы согласно изобретению могут дополнительно включать константные области антитела или их части, например, константные области человеческого антитела или их части. Например, VL-домен может быть прикреплен своей C-концевой областью к константным доменам легкой цепи антитела, включая человеческие Ск- или Сл-цепи, например, Сл-цепи. Сходным образом, связывающий элемент на основе VH-домена может быть прикреплен своей C-концевой областью к полной или частичной (например, CH1- домен) тяжелой цепи иммуноглобулина, полученной из антитела любого изотипа, например, IgG, IgA, IgE и IgM, и любого из субклассов этих изотипов, в частности, IgG1 и IgG4. Любая синтетическая константная область или же другой вариант константной области, которая обладает этими свойствами и стабилизирует переменные области, также применима в воплощениях настоящего изобретения.

Связывающие элементы согласно изобретению можно пометить детектируемой или функциональной меткой. Меткой может быть

любая молекула, которая продуцирует или которую можно стимулировать к продуцированию сигнала, включая, но не ограничиваясь перечисленным, флуоресцентные метки, радиоактивные метки, ферменты, хемилюминесцентные метки или фотосенсибилизирующие средства. Таким образом, связывание может быть детектировано и/или измерено путем детектирования флуоресценции или люминесценции, радиоактивности, ферментативной активности или поглощения света. Детектируемые метки могут быть прикреплены к антителам согласно изобретению с привлечением обычных химических методов, известных в данной области.

Известен целый ряд способов, посредством которых метка может продуцировать сигнал, детектируемый извне, например, путем визуального наблюдения, такой как электромагнитное излучение, теплота и химические реагенты. Метка может быть также связана с другим связывающим элементом, который связывается с антителом согласно изобретению или с подложкой.

Меченые связывающие элементы, например, scFv, меченные детектируемой меткой, могут быть использованы для диагностики *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*, и/или для терапии.

Например, радиоактивно меченные связывающие элементы (например, связывающие элементы, конъюгированные с радиоактивным изотопом) могут быть использованы в радиодиагностике и радиотерапии. Радиоактивные изотопы, которые могут быть конъюгированы со связывающим элементом согласно изобретению, включают изотопы, такие как  $^{94m}\text{Tc}$ ,  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{203}\text{Pb}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{88}\text{Y}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{121}\text{Sn}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{105}\text{Rh}$  и  $^{177}\text{Lu}$ .

Например, связывающий элемент согласно изобретению, меченный детектируемой меткой, может быть использован для обнаружения, диагностики или мониторинга опухолевых метастазов и/или опухолевых метастазов у человека или животного. Связывающий элемент может быть введен человеку или животному, обычно пациенту-человеку, и затем можно определить наличие или отсутствие антитела на участке, отдаленном от участка, который занят в настоящее время или который ранее был занят первичной

опухолью у человека или животного; локализация молекулы антитела на участке, отдаленном от участка, который занят в настоящее время или который ранее был занят первичной опухолью у человека или животного, свидетельствует о наличии опухолевых метастазов и/или метастазирования опухоли.

Связывающий элемент согласно изобретению может быть использован для производства диагностического продукта для применения в диагностике опухолевых метастазов.

Настоящее изобретение относится также к способу обнаружения или диагностики опухолевых метастазов у человека или животного, включающему стадии:

(a) введения человеку или животному связывающего элемента согласно изобретению, например, меченого детектируемой меткой, которая связывается с изоформой ED-A фибронектина и/или с ED-A фибронектина, и

(b) определения наличия или отсутствия связывающего элемента на участке, отдаленном от участка, который занят в настоящее время или который ранее был занят первичной опухолью у человека или животного;

где локализация связывающего элемента на участке, отдаленном от участка, который занят в настоящее время или который ранее был занят первичной опухолью у человека или животного, свидетельствует о наличии опухолевых метастазов, причем связывающий элемент является меченым детектируемой меткой, а наличие или отсутствие детектируемой метки может быть определено путем детектирования метки.

Связывающий элемент согласно изобретению может быть использован также для измерения уровней антигена в конкурентном анализе, иными словами, способом измерения уровня антигена в образце с использованием связывающего элемента согласно изобретению является способ конкурентного анализа. Это относится к случаю, когда не требуется физического отделения связанного антигена от несвязанного. Одной из возможностей является такое связывание репортерной молекулы со связывающим элементом, при котором связывание как таковое вызывает физическое или оптическое изменение. Репортерная молекула может

прямо или опосредованно порождать детектируемые сигналы, которые могут быть оценены количественно. Связывание репортерных молекул может быть прямым или опосредованным, ковалентным, например, через пептидную связь, или нековалентным. Связывание через пептидную связь может произойти в результате рекомбинантной экспрессии слияния генов, кодирующих антитело и репортерную молекулу.

Конкурентные анализы могут быть использованы также в картировании эпитопов. В одном случае картирование эпитопов может быть использовано для идентификации эпитопа, связанного со связывающим элементом. Такой эпитоп может быть линейным или конформационным. Конформационный эпитоп может содержать по меньшей мере два различных фрагмента А-FN или ED-A фибронектина, причем эти фрагменты должны находиться на расстоянии друг от друга, когда происходит пространственная упаковка А-FN или ED-A фибронектина, и они приобретают свою третичную или четвертичную структуру, с образованием конформационного эпитопа, который распознается элементом, связывающимся с А-FN или ED-A фибронектина. В конкурентном анализе может быть использован пептидный фрагмент антигена, в частности, пептид, включающий или в основном состоящий из представляющего интерес эпитопа. Может быть использован пептид, содержащий последовательность эпитопа плюс одну или более аминокислот на любом из его концов. Связывающие элементы согласно изобретению могут быть такими, что их связывание с антигеном будет ингибироваться пептидом, включающим данную последовательность или состоящим из нее.

В дальнейших аспектах настоящего изобретения используется конъюгат или слияние связывающего элемента согласно изобретению и молекулы, которая оказывает биоцидное или цитотоксическое действие на клетки-мишени в областях повреждения, и антитела, направленного против компонента внеклеточного матрикса, который присутствует в таких областях повреждения. Например, биоцидной или цитотоксической молекулой может быть интерлейкин-2 (IL-2), доксорубин, интерлейкин-12 (IL-12), интерферон-гамма (IFN- $\gamma$ ),

фактор некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ) или тканевый фактор (предпочтительно, укороченный). Такие конъюгаты могут иметь терапевтическое применение, например, для лечения опухолевых метастазов и/или опухоли, как указано в настоящем описании. Производство и применение слияний или конъюгатов связывающих элементов с биоцидными или цитотоксическими молекулами описано, например, в заявке WO 01/62298, которая включена в настоящее описание в виде ссылки.

В одном аспекте изобретение относится к способу лечения метастазирования опухоли и/или опухолевых метастазов, включающим введение индивидууму терапевтически эффективного количества лекарственного средства, содержащего связывающий элемент согласно изобретению. Связывающий элемент может быть конъюгатом (i) молекулы, которая оказывает биоцидное или цитотоксическое действие на клетки-мишени в результате клеточного взаимодействия, и (ii) элемента, связывающегося с изоформой ED-A фибронектина и/или с ED-A-доменом фибронектина.

В другом аспекте изобретение относится к применению связывающего элемента согласно изобретению для получения лекарственного средства для лечения опухолевых метастазов и/или метастазирования опухоли. Связывающий элемент может быть конъюгирован или слит с молекулой, которая, как в настоящем изобретении описано, оказывает биоцидное или цитотоксическое действие. Связывающий элемент может быть конъюгатом (i) молекулы, которая оказывает биоцидное или цитотоксическое действие на клетки-мишени в результате клеточного взаимодействия, и (ii) элемента, связывающегося с человеческим фибронектином согласно изобретению.

В дополнительном аспекте изобретение относится к конъюгату (i) молекулы, которая оказывает биоцидное или цитотоксическое действие на клетки-мишени в результате клеточного взаимодействия, и (ii) элементу, связывающегося с человеческим фибронектином согласно изобретению, для применения в способе терапевтического лечения организма человека или животного. Такое лечение может быть лечением опухолевых метастазов и/или метастазирования опухоли.

Еще в одном дополнительном аспекте изобретения предложен конъюгат (i) молекулы, которая оказывает биоцидное или цитотоксическое действие на клетки-мишени в результате клеточного взаимодействия, и (ii) элемента, связывающегося с человеческим фибронектином согласно изобретению. Такой конъюгат предпочтительно включает слитый белок, содержащий биоцидную или цитотоксическую молекулу и указанный связывающий элемент, или, когда связывающий элемент является двухцепочечным или мультицепочечным, слитый белок, содержащий биоцидную или цитотоксическую молекулу и компонент полипептидной цепи указанного связывающего элемента. Предпочтительно, чтобы связывающий элемент был одноцепочечным полипептидом, например, одноцепочечной молекулой антитела, таким как scFv. Таким образом, в дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен слитый белок, содержащий биоцидную или цитотоксическую молекулу и одноцепочечную Fv-молекулу антитела согласно изобретению.

Биоцидная или цитотоксическая молекула, которая оказывает свое действие на клетки-мишени в результате клеточного взаимодействия, может взаимодействовать непосредственно с клеткой-мишенью, может взаимодействовать с мембрано-связанным рецептором на клетке-мишени или искажать электрохимический потенциал клеточной мембраны. Молекулы, которые взаимодействуют с мембрано-связанным рецептором, включают хемокины, цитокины и гормоны. Соединения, которые искажают электрохимический потенциал клеточной мембраны, включают гемолизин, ионофоры, лекарственные средства, действующие на ионные каналы. В предпочтительных иллюстративных воплощениях молекулой является интерлейкин-2, тканевый фактор (предпочтительно, укороченный) или доксорубин. В других воплощениях может быть использован интерлейкин-12, интерферон-гамма, IP-10 и фактор некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ).

Как дополнительно обсуждается ниже, специфический связывающий элемент предпочтительно является антителом, или же он содержит антиген-связывающий участок антитела. Удобно, когда специфический связывающий элемент может быть одноцепочечным



полипептидом, таким как одноцепочечное антитело. Это создает удобство при продуцировании слитого белка, содержащего одноцепочечное антитело и биоцидную или цитотоксическую молекулу (например, интерлейкин-2 или тканевый фактор). В других воплощениях антиген-связывающий участок антитела получают путем объединения VH-домена антитела и VL-домена антитела в отдельных полипептидах, например, в полном антителе или во фрагменте антитела, таком как Fab-фрагмент или димерное антитело. Когда специфический связывающий элемент является двухцепочечной или мультицепочечной молекулой (например, Fab-фрагментом или целым антителом, соответственно), биоцидная или цитотоксическая молекула может быть конъюгирована в виде слитого полипептида с одной или более полипептидными цепями в специфическом связывающем элементе.

Связывающий элемент может быть конъюгирован с биоцидной или цитотоксической молекулой путем образования пептидной связи, т.е. внутри слитого полипептида, содержащего указанную молекулу и специфический связывающий элемент или компонент его полипептидной цепи. См. публикации Taniguchi et al. (1983) *Nature* 302, 305-310; MaED-A et al. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 115: 1040-1047; Devos et al. (1983) *Nucl. Acids Res.* 11: 4307-4323 в отношении информации по последовательности IL-2, полезной при получении слитого полипептида, содержащего IL-2. Информация относительно последовательности укороченного тканевого фактора представлена у Scarpati et al. (1987) *Biochemistry* 26: 5234-5238, и Ruf et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 226: 15719-15725. Другие способы конъюгирования включают химическую конъюгацию, в частности, поперечное связывание с использованием бифункционального реагента (например, с помощью руководства по селекции поперечно-связывающих реагентов, DOUBLE-REAGENTS™, Pierce).

Когда желательно медленное высвобождение, например, когда биоцидной или цитотоксической молекулой является доксорубин или другая молекула, которая искажает электрохимический потенциал клеточной мембраны, химическая конъюгация может происходить путем образования основания Шиффа (имин) между

первичной аминогруппой специфического связывающего элемента (полипептид, такой как антитело или фрагмент антитела) и окисленным сахарным фрагментом (даунозамин) биоцидной или цитотоксической молекулы, такой как доксорубин.

Настоящее изобретение дополнительно относится к изолированной нуклеиновой кислоте, кодирующей связывающий элемент согласно изобретению. Нуклеиновая кислота может включать ДНК и/или РНК. В одном аспекте настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, которая кодирует CDR или набор областей CDR, или VH-домен или VL-домен, или же антиген-связывающий участок антитела или молекулу антитела, например, scFv или IgG, например, IgG1, согласно изобретению, как было сказано выше. Предпочтительными нуклеотидными последовательностями являются нуклеотидные последовательности, кодирующие описанные в настоящем изобретении VH- и/или VL-домены.

Настоящее изобретение включает также конструкции в виде плазмид, векторов, транскрипционных или экспрессирующих кассет, которые содержат по меньшей мере один полинуклеотид, как указано выше.

Настоящее изобретение включает также рекомбинантную клетку-хозяина, которая включает одну или более указанных выше конструкций. Как было установлено, нуклеиновая кислота, кодирующая любую область CDR или набор CDR, или VH-домен или VL-домен, или же антиген-связывающий участок антитела или молекулу антитела, например, scFv или IgG1, или IgG4, как таковая образует один из аспектов настоящего изобретения, также как и способ продуцирования кодируемого ею продукта, причем этот способ включает экспрессию с кодирующей нуклеиновой кислоты. Удобно добиться экспрессии путем культивирования в подходящих условиях рекомбинантных клеток-хозяев, содержащих указанную нуклеиновую кислоту. VH-домен или VL-домен, или связывающий элемент, образующиеся в результате экспрессии, могут быть изолированы и/или очищены с помощью любой подходящей технологии, а затем использованы по необходимости.

Нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению может

содержать ДНК или РНК и может быть полностью или частично синтетической. Указанная в настоящем изобретении ссылка на нуклеотидную последовательность включает молекулу ДНК со специфической последовательностью и включает молекулу РНК со специфической последовательностью, в которой, если специально не указано иначе, тимин (Т) заменен урацилом (U).

Еще в одном дополнительном аспекте предусмотрен способ продуцирования переменного VH-домена антитела, включающий инициацию экспрессии с кодирующей нуклеиновой кислоты. Такой способ может включать культивирование клеток в условиях, в которых продуцируется указанный переменный VH-домен антитела.

Аналогичные способы продуцирования переменных VL-доменов и связывающих элементов, содержащих VH- и/или VL-домен, составляют дальнейшие аспекты настоящего изобретения.

Способ продуцирования может включать стадию выделения и/или очистки указанного продукта. Способ продуцирования может включать включение продукта в состав композиции, включающей по меньшей мере один дополнительный компонент, такой как фармацевтически приемлемый наполнитель.

Системы для клонирования и экспрессии полипептида в различных клетках-хозяевах хорошо известны. Подходящие клетки-хозяева включают бактерии, клетки млекопитающих, клетки растений, нитчатых грибов, дрожжей и бакуловирусных систем и трансгенных растений и животных. Экспрессия антител и антительных фрагментов в прокариотических клетках является хорошо установленной в данной области. См., например, обзор Pluckthun 1991. Обычно используемой бактериальной клеткой-хозяином является *E coli*.

Экспрессия в эукариотических клетках в культуре также хорошо известна специалистам в данной области как возможность продуцирования связывающего элемента - например, Chadd & Chamow (2001), Andersen & Kruppen (2002), Larrick & Thomas (2001). Линии клеток млекопитающих для экспрессии гетерологичного полипептида, доступные в данной области, включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки HeLa, клетки почек детеныша хомячка, клетки NS0 мышью меланомы, клетки крысиной

миеломы УВ2/0, клетки эмбриональной почки человека, клетки эмбриональной сетчатки человека и многие другие.

Можно выбрать или сконструировать подходящие векторы, содержащие, по необходимости, соответствующие регуляторные последовательности, включая промоторные последовательности, последовательности терминатора, последовательности полиаденилирования, энхансерные последовательности, маркерные гены и другие последовательности. Векторами могут быть, по необходимости, плазмиды, например, фагмиды, или вирусы, например, фаги. Более подробно см., например, Sambrook & Russell (2001). Многие известные технологии и методики, в которых описаны манипуляции с нуклеиновыми кислотами, например, при получении конструкций нуклеиновых кислот, мутагенезе, секвенировании, введении ДНК в клетки и генной экспрессии, а также анализ белков, подробно описаны у Ausubel, 1999.

Дальнейший аспект настоящего изобретения связан с клеткой-хозяином, содержащей описанную в настоящем изобретении нуклеиновую кислоту. Такой клеткой-хозяином может быть клетка *in vitro* и может быть клетка в культуре. Такой клеткой-хозяином может быть клетка *in vivo*. То, что клетка-хозяин находится *in vivo*, может позволить реализацию внутриклеточной экспрессии связывающих элементов согласно изобретению в виде внутриклеточных антител, или "intrabodies". Внутриклеточные антитела могут быть использованы для генной терапии.

Еще в одном аспекте предложен способ, предусматривающий введение нуклеиновой кислоты согласно изобретению в клетку-хозяина. Такое введение может быть осуществлено с использованием любой доступной технологии. Для эукариотических клеток подходящие технологии могут включать трансфекцию с применением кальций-фосфата, DEAE-декстран, электропорацию, опосредованную липосомами трансфекцию и трансдукцию с помощью ретровируса или другого вируса, например, вируса осповакцины, или, в случае клеток насекомых, бакуловируса. Для введения нуклеиновой кислоты в клетки-хозяева, в частности, эукариотические клетки, можно использовать системы на основе вируса или плазмиды. Плазмидная система может поддерживаться на

эписомном уровне или может быть встроена в клетку-хозяина или в искусственную хромосому. Встраивание может быть либо случайным, либо оно может представлять собой нацеленную интеграцию одной или более копий в один или во множество локусов. В случае бактериальных клеток подходящие технологии могут включать трансформацию с применением хлористого кальция, электропорацию и трансфекцию с помощью бактериофага.

Такое введение может сопровождаться инициацией или предоставлением возможности для экспрессии с нуклеиновой кислоты, например, путем культивирования клеток-хозяев в условиях, подходящих для экспрессии, этого гена. Очистка экспрессированного продукта может быть достигнута способами, известными специалистам в данной области.

В соответствии с настоящим изобретением, нуклеиновая кислота согласно изобретению может быть интегрирована в геном (например, хромосому) клетки-хозяина. Интеграция может быть стимулирована включением последовательностей, которые осуществляют промоцию рекомбинации с геномом, в соответствии со стандартными технологиями.

Настоящее изобретение связано также со способом, который включает применение конструкции в экспрессирующей системе, как было указано выше, для экспрессирования связывающего элемента или полипептида, как указано выше.

Связывающие элементы согласно изобретению сконструированы для использования в способах диагностики или лечения человека или животных, например, человека. Связывающие элементы могут быть использованы в диагностике или лечении опухолевых метастазов и/или метастазирования опухолей.

Соответственно, дальнейшие аспекты изобретения связаны со способами лечения, включающими введение предусмотренного связывающего элемента, фармацевтическими композициями, содержащими такой связывающий элемент, и применением такого связывающего элемента в изготовлении лекарственного средства для введения пациенту, например, в способе изготовления лекарственного средства или фармацевтической композиции, предусматривающем создание рецептуры, содержащей связывающий

элемент в составе с фармацевтически приемлемым наполнителем. Фармацевтически приемлемые носители хорошо известны и будут подбираться специалистами в данной области, в зависимости от природы и способа введения выбранного активного соединения (соединений).

Связывающие элементы согласно изобретению будут, как правило, вводить в виде фармацевтической композиции, которая, помимо связывающего элемента, может включать по меньшей мере один компонент. Таким образом, фармацевтические композиции согласно изобретению, а также таковые для применения согласно настоящему изобретению, могут содержать, помимо активного ингредиента, фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель, буфер, стабилизатор или другие вещества, хорошо известные специалистам в данной области. Такие вещества должны быть нетоксичными и не должны искажать эффективность активного ингредиента. Точная природа носителя или других веществ будет зависеть от пути введения, который может быть пероральным путем введения, введением путем ингаляции или путем инъекции, например, внутривенной.

Фармацевтические композиции для перорального введения, такие, например, как нанотела, и пр., также включены в объем настоящего изобретения. Такие пероральные композиции могут быть представлены в виде таблеток, капсул, порошков, жидкостей, или же они могут быть представлены в виде полутвердых форм. Таблетка может включать твердый носитель, такой как желатин или адъювант. Жидкие фармацевтические композиции обычно включают жидкий носитель, такой как вода, углеводороды, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Могут быть включены также физиологический солевой раствор, декстроза или другой раствор сахаридов, или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль.

В случае внутривенных инъекций или инъекций на участке повреждения, активный ингредиент будет представлен в виде парентерально приемлемого водного раствора, который является апирогенным, имеет соответствующее значение pH, изотоничность и стабильность. Все специалисты в сферах, связанных с данной

областью, хорошо ориентируются в приготовлении соответствующих растворов с использованием, например, изотонических носителей, таких как хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, раствор Рингера с лактатом для инъекций. В случае необходимости могут быть использованы консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки. Специалистам в данной области известно много способов приготовления фармацевтических композиций. См., например,, Robinson, 1978.

Композицию можно вводить отдельно или в сочетании с другими видами лечения, одновременно или последовательно, или же в виде комбинированного средства в сочетании с другим терапевтическим агентом или агентами, в зависимости от того состояния, которое подвергается лечению.

Связывающий элемент для А-FN и/или ED-A фибронектина может быть использован как часть комбинированной терапии в сочетании с дополнительным медикаментозным компонентом. Комбинированное лечение может быть использовано для обеспечения значительных синергических эффектов, в частности, комбинация связывающего элемента, который связывается с А-FN и/или ED-A фибронектина, с одним или несколькими другими лекарственными средствами. Связывающий элемент для А-FN и/или ED-A фибронектина можно вводить одновременно или последовательно, или же в виде комбинированного средства в сочетании с другим терапевтическим средством или средствами, для лечения одного или более перечисленных в настоящем изобретении состояний.

Например, связывающий элемент согласно изобретению может быть использован в сочетании с уже существующим терапевтическим средством для лечения опухолевых метастазов и/или метастазирования опухоли. Существующие терапевтические средства для лечения опухолевых метастазов и/или метастазирования опухоли включают доксорубицин, таксол, гемцитабин, сорафениб, мелфалан и авастин.

Связывающий элемент согласно изобретению и один или более из перечисленных выше дополнительных лекарственных компонентов могут быть использованы в изготовлении лекарственного средства.

Лекарственное средство может быть предназначено для отдельного или комбинированно введения индивидууму и, соответственно, может включать связывающий элемент в виде комбинированного лекарственного средства или в виде отдельных лекарственных средств. Раздельные лекарственные средства могут быть использованы для облегчения раздельного и последовательного или одновременного введения и создают возможность для введения компонентов различными путями, например, для введения пероральным и парентеральным путями.

В соответствии с настоящим изобретением, предлагаемые композиции можно вводить животным. Введение может осуществляться в "терапевтически эффективном количестве", которого должно быть достаточно для выявления улучшения состояния пациента. Такое улучшение по меньшей мере может представлять собой улучшение по меньшей мере одного симптома. Конкретно вводимое количество, а также скорость и временной график введения будут зависеть от природы и тяжести состояния, которое подвергают лечению, конкретного млекопитающего, которое подвергается лечению, клинического состояния индивидуального пациента, причины нарушения, участка, в который должна быть доставлена композиция, от типа связывающего элемента, способа введения, режима введения и других факторов, известных практикующим врачам. Ответственность за рекомендации в связи с лечением, например, определением дозировок и пр., полностью ложится на лечащего врача и других врачей и может зависеть от тяжести симптомов и/или прогрессирования заболевания, которое подвергается лечению. Подходящие дозы антитела хорошо известны в данной области (Ledermann, 1991 и Bagshawe, 1991). Можно использовать специфические дозировки, указанные в настоящем изобретении или в Настольном справочнике врача (2003), в зависимости от типа вводимого лекарственного средства. Терапевтически эффективное количество или подходящую дозу связывающего элемента согласно изобретению можно определить путем сравнения его активности *in vitro* и активности *in vivo* на животной модели. Способы экстраполяции дозировок, эффективных для мышей и других тестируемых животных, на человека хорошо



известны. Точная доза будет зависеть от целого ряда факторов, включая то, используется ли конкретное антитело для диагностики, профилактики или лечения, от размера и локализации участка, подвергаемого лечению, точной природы антитела (например, целое антитело, фрагмент антитела или димерное антитело), и природы какой-либо детектируемой метки или другой молекулы, прикрепленной к этому антителу. Обычно доза антитела варьирует в пределах от 100 мкг до 1 г в случае системного введения, и от 1 мкг до 1 мг в случае местного введения. Можно ввести начальную нагрузочную дозу, а затем последующие одну или несколько более низких доз. Антитело может быть целым антителом, например, антителом IgG1 или IgG4-изотипа. Это - доза для однократного введения взрослому пациенту, которая может быть пропорционально сведена к детской или младенческой дозе, также как и пересчитана на случай антитела другого формата пропорционально молекулярному весу. Лечебное воздействие можно повторять ежедневно, два раза в неделю, с недельными или месячными интервалами, по усмотрению лечащего врача. В случае подкожного введения лечебное воздействие можно осуществлять каждые две или четыре недели, а в случае внутривенного введения - каждые четыре-восемь недель. В некоторых воплощениях настоящего изобретения лечебное воздействие является периодическим, и период между введениями составляет приблизительно две или более недель, например, приблизительно три или более недель, приблизительно четыре или более недель, или же периодичность составляет приблизительно один раз в месяц. В других воплощениях настоящего изобретения лечебное воздействие может быть оказано перед и/или после операции, и оно может быть осуществлено путем введения или наложения непосредственно на анатомический участок хирургического воздействия.

Дальнейшие аспекты и воплощения настоящего изобретения станут очевидны специалистам в данной области в свете настоящего описания, включая и нижеследующие экспериментальные иллюстративные примеры.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### Животная модель

Эксперименты на животных были одобрены Швейцарской федеральной ветеринарной Службой и предприняты в соответствии со Швейцарским Предписанием по защите животных. Проводили регулярный мониторинг мышей. При любых признаках боли или страдания или же в случае потери веса более чем на 15% животных умерщвляли. Самцам мышей Sv129 (RCC, Fullingsdorf, Switzerland) внутривенно путем инъекции вводили  $\sim 10^6$  мутантных клеток F9 мышинной тератокарциномы (Terrana et al. 1987), которые были предоставлены Dario Rusciano (SIFI, Catania, Italy). Через 3 недели после инъекции опухолевых клеток мышей использовали для *in vivo* биотинилирования, в экспериментах по таргетированию или для удаления органа для иммуногистохимии.

#### *In vivo* биотинилирование

Эксперименты по биотинилированию *in vivo* проводили так, как было описано ранее (Roesli et al. 2006, Rybak et al. 2005). Вкратце, грудную клетку анестезированных мышей вскрывали, осуществляя срединную стернотомию. Левый желудочек сердца пунктировали перфузионной иглой, а в правом предсердии делали маленький надрез, чтобы обеспечить отток перфузируемых растворов. Непосредственно вслед за этим осуществляли перфузию системы кровообращения, с давлением 100 мм Hg при скорости потока 1,5 мл/мин. На первой стадии перфузию осуществляли 15 мл раствора для биотинилирования (предварительно нагретого до 38°C), содержащего 1 мг/мл sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce, Rockford, IL, USA) в PBS, pH 7,4, обогащенного 10% (масса/объем) декстраном-40 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) в качестве вещества, увеличивающего объем плазмы крови. Таким образом, компоненты крови, которые могли бы принять участие в реакции биотинилирования, были изъяты из системы кровообращения в течение первых нескольких минут перфузии, и белки, содержащие доступный первичный амин (и определенные гликолипиды и фосфолипиды), в разных тканях могли быть

модифицированы биотином. Для нейтрализации непрореагировавшего биотинилирующего реагента биотинилирование *in vivo* сопровождалось 10-минутной стадией промывания раствором 50 мМ Tris, 10% (масса/объем) декстрана-40, в PBS, pH 7,4, предварительно нагретого до 38°C. В процессе перфузии биотинилирующим реагентом (и в течение первых трех минут последующей перфузии блокирующим раствором) область вокруг сердца промывали раствором 50 мМ Tris в PBS, pH 7,4 (38°C), чтобы нейтрализовать поступающий извне непрореагировавший биотинилирующий реагент и избежать нежелательного мечения молекул на поверхности органов. После перфузии органы и опухоли извлекали, и свежие образцы либо мгновенно замораживали для приготовления гомогенатов органов, либо погружали, вдавливая в охлажденную матрицу (Microm, Walldorf, Germany), и замораживали в изопентане и в жидком азоте, с получением срезов из замороженных тканей для гистохимического анализа. Неперфузированных мышей использовали в качестве отрицательного контроля для анализов методами протеомики.

#### **Приготовление белковых экстрактов для анализов методами протеомики**

Образцы ресуспендировали в 40 мкл лизирующего буфера на мг ткани (2% ДСН, 50 мМ Tris, 10 мМ ЭДТА, полный коктейль ингибитора протеиназы E (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) в PBS, pH 7,4) и гомогенизировали с помощью измельчителя Ultra-Turrax T8 (IKA-Werke, Staufen, Germany). Гомогенаты подвергали действию ультразвука, используя установку Vibra-cell (Sonics, New Town, CT, USA), с последующими 15-минутной инкубацией при 99° С и 20-минутным центрифугированием при 15000xg. Супернатант использовали в качестве полного белкового экстракта. Концентрацию белка определяли с помощью набора BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce).

#### **Очистка биотинилированных белков**

Для каждого образца по 960 мкл пастообразной смеси стрептавидин-сефарозы (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) трижды промывали в буфере А (NP40 1%, ДСН 0,1% в PBS), осаждали

и смешивали с 15 миллиграммами полного белкового экстракта. Сбор биотинилированных белков выполняли в течение 2 ч при комнатной температуре во вращающемся миксере. Супернатант удаляли, а осадок трижды промывали буфером А, дважды - буфером В (0,1% NP40, 1 М NaCl в PBS), и один раз - 50 мМ бикарбонатом аммония. В конце осадок ресуспендировали в 400 мкл 50 мМ раствора бикарбоната аммония, и затем добавляли 20 мкл модифицированного трипсина свиньи, имеющего степень чистоты для секвенирования (сток-раствор - 40 нг/мкл в 50 мМ бикарбонате аммония) (Promega, Madison, WI, USA). Протеолитическое расщепление проводили в течение ночи при 37°C при постоянном перемешивании. Пептиды обессоливали, очищали и концентрировали на микроколонках C18 (ZipTip C18, Millipore, Billerica, MA, USA). После лиофилизации пептиды хранили при -20°C.

**Нано-капиллярная ВЭЖХ с автоматизированной online-фракцией, наносимой на планшеты для автоматической идентификации мишени**

#### **MALDI**

Триптические пептиды отделяли с помощью высокоэффективной хроматографии с обращенной фазой (ОФ ВЭЖХ), используя нано-масштабную систему ЖХ UltiMate и микро-автодозатор FAMOS (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands), контролируемую программным обеспечением Chromeleon (Dionex, Sunnyvale, CA, USA), мобильная фаза А состояла из 2% ацетонитрила и 0,1% трифторуксусной кислоты (TFA) в воде, мобильная фаза В представляет собой 80% ацетонитрил и 0,1% TFA в воде. Скорость потока составляет 300 нл/мин. Лиофилизированные пептиды, полученные в результате триптического переваривания биотинилированных белков, очищенных на основании их аффинности из 1,5 мг общего белка, растворяли в 5 мкл буфера А и наносили на колонку (внутренний диаметр: 75 мкм, длина 15 см, наполнена C18 PerMap 100, 3 мкм, бусинки в 100 Å; уплотнители ЖХ). Пептиды элюировали в градиенте 0-30% В в течение 7 мин., 30-80% В в течение 67 мин., 80-100% В в течение 3 мин. и 100% В в течение 5 мин.; колонку уравнивали 100% А в течение 20 мин. перед нанесением следующего образца. Элюированные фракции

смешивали с раствором 3 мг/мл  $\alpha$ -циано-4-гидрокси-фенилакриловой кислоты, 277 пмоль/мл нейротензина (внутренний стандарт), 0,1% TFA и 70% ацетонитрила в воде и вносили в лунки 192-луночного планшета мишени MALDI с использованием on-line-системы Probot (Dionex). Скорость потока матричного раствора MALDI устанавливали на уровне 1,083 мкл/мин. Таким образом, каждая фракция, собираемая в течение 20 сек., содержала 361 нл матричного раствора MALDI и 100 нл образца. Конечная концентрация нейротензина составляла 100 фмоль на лунку.

#### **MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрия**

MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрический анализ проводили с помощью протеомного анализатора 4700 (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA). Для выбора иона-предшественника все фракции измеряли MS-методом перед проведением тандемной масс-спектрометрии MS/MS. Максимум из 15 предшественников на образец отбирали для последующей фрагментации путем индуцированной столкновениями диссоциацией. Спектры обрабатывали и анализировали с помощью Всемирного Сервера Global Protein Server Workstation (Applied Biosystems), в котором используется собственное программное обеспечение MASCOT (Matrix Science, London, UK) для сопоставления данных MS и MS/MS с базами данных по компьютерному моделированию расщепленных (переваренных) белков. Полученные данные были подвергнуты скринингу против мышинной базы данных, загруженной с начальной страницы NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Идентификация белков (при наномолярной концентрации), выполненная с использованием программного обеспечения MASCOT, была признана корректной, с 95% доверительным интервалом для наилучшего иона-предшественника.

Масс-спектрометрические анализы MALDI-TOF и MALDI-TOF/TOF проводили с помощью протеомного анализатора 4700 (Applied Biosystems). Пептидные массы получали в интервале от 750 до 4000  $m/z$ , с максимумом при 2000  $m/z$ . MS-спектры были суммированы из 2000 импульсов неодимового лазера Nd: YAG-лазер работал при 355 нм и 200 Гц. Автоматизированную калибровку пластин предпринимали с использованием пяти пептидных

стандартов (массы 900-2400 m/z; Applied Biosystems) в шести калибровочных лунках. Эту калибровку пластин использовали для внесения поправок в связи с погрешностями измерительного прибора для точного определения массы, и ее применяли ко всем MS- и MS/MS-спектрам. Кроме того, производили внутреннюю калибровку каждого MS-спектра, используя внутренний стандарт пептида, добавленного к матрице MALDI. Максимум из 15 предшественников на лунку с отношением сигнал-шум, составляющим >100, автоматически отбирали для последующей фрагментации путем индуцированной столкновениями диссоциации. MS/MS-спектры были суммированы из 2500-5000 лазерных импульсов. Спектры обрабатывали и анализировали с помощью Всемирного Сервера Global Protein Server Workstation (Applied Biosystems), в котором используется собственное программное обеспечение MASCOT (Matrix Science) для сопоставления данных MS и MS/MS с базами данных по компьютерному моделированию расщепленных белков. Исследуемыми параметрами MASCOT были (i) мышиная база данных, загруженная с начальной страницы Европейского Института Биоинформатики (EBI) на 9-ое сентября 2006: ([ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/SPproteomes/fasta/proteomes/59.M\\_musculus.fasta.gz](ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/SPproteomes/fasta/proteomes/59.M_musculus.fasta.gz)); (ii) фермент: трипсин и семи-трипсин; (iii) дозволенное число пропущенных расщеплений: 1; (iv) переменные посттрансляционные модификации: окисление метионина; (v) толерантность пептида:  $\pm 30$  ppm; (vi) MS/MS-толерантность:  $\pm 0,2$  Да; (vii) заряд пептида: +1; (viii) минимальная оценка иона, C.I., в %, для пептидов: 95; и (ix) максимальная оценка пептида: 1. Кроме того, был использован MS/MS-пик, фильтруемый в соответствии со следующими параметрами: (i) колебание массы: от 60 Да до 20 Да ниже массы предшественника; (ii) минимальное отношение сигнал/шум: 6; (iii) фильтр плотности пика: максимум 30 пиков на 200 Да; и (iv) максимальное число пиков на спектр: 65.

#### **Антитела**

Выделение фрагмента scFv(L19) анти-ED-B-антитела было описано ранее (Pini et al. 1998). Родительское анти-ED-A-антитело было выделено из библиотеки ETH-2 с применением

опубликованной методики (Giovannoni, *Nucleic Acid Research*, 2001, 29(5): E27). Созревание аффинности родительского анти-ED-A-антитела, с получением высокоаффинных анти-ED-A-антител, описано в следующем разделе.

#### **Созревание аффинности родительского анти-ED-A-антитела**

Родительское анти-ED-A-антитело (антитело, полученное из ETH-2) было использовано в качестве матрицы для создания библиотеки антител с развитой аффинностью. Вариабельность последовательности в области VH-CDR1 (зародышевая линия DP47) и VL-CDR1 (зародышевая линия DPK22) этой библиотеки вводили посредством ПЦР с использованием частично вырожденных праймеров 5'-CTGGAGCCTGGCGGACCCAGCTCATMNNMNNMNGCTAAAGGTGAATCCAGA-3' (SEQ ID NO: 17) для VH и 5'-CCAGGTTTCTGCTGGTACCAGGCTAAMNNMNNMNGCTAACACTCTGACTGGCCCTGC-3' (SEQ ID NO: 18) для VL (все олигонуклеотиды были приобретены в компании Operon Biotechnologies, Cologne, Germany), руководствуясь способом, в котором образуются случайные мутации в положениях 31, 32 и 33 области VH-CDR1 и в положениях 31, 31a и 32 области VL-CDR1. VHVL-комбинации были объединены в формате scFv посредством сборки с помощью ПЦР с использованием праймеров LMB3long (5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC-3') (SEQ ID NO: 19) и fdseqlong (5'-GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG-3') (SEQ ID NO: 20), с использованием гель-очищенных VH- и VL-сегментов в качестве матриц. Объединенные VH-VL-фрагменты были дважды подвергнуты расщеплению под действием NcoI/NotI и клонированы в NcoI/NotI-расщепленный фагемидный вектор pHEM1 (Hoogenboom et al., 1991). Полученный в результате продукт лигирования был электропорирован в электрокомпетентные TG-1-клетки *E. coli*, согласно Viti et al., 2000, с получением библиотеки, содержащей  $1,5 \times 10^7$  клонов индивидуальных антител, которые были подвергнуты скринингу на предмет выявления антител, которые с улучшенной аффинностью связываются с ED-A.

#### **Селекция анти-ED-A-антител**

Описанную выше библиотеку антител подвергали скринингу на предмет выявления антител, которые связываются с ED-A с большей

аффинностью, чем аффинность родительского анти-ED-A-антитела, с использованием анализа BIAcore. Антиген (11A12), используемый при BIAcore-анализе, содержал ED-A-домен фибронектина человека и имел следующую аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 120):

MRSYRTEIDKPSQMQVTDVQDNSISVKWLPSSSPVTGYRVTTTPKNGPGPTKTKTAGPDQ  
 TEMTIEGLQPTVEYVVSUYAQNPSPGESQPLVQTAVTNIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWES  
 PQGQVSRYRVTYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELOGLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPL  
 IGTQSTAIAPPTDLKFTQVTPTSLSAQWTPPNVQLTGYRVRVTPKEKTGPMKEINLAPDS  
 SSVVVSGLMVATKYEVSVYALKDTLTSRPAQGVVTTLENVRSHHHHHH

Нуклеотидная последовательность антигена (11A12) (SEQ ID NO: 121) является следующей:

atgagatcctaccgaacagaaattgacaaaccatcccagatgcaagtgaccgatgttcaggaca  
 acagcattagtgcaagtggctgccttcaagttcccctgttactggttacagagtaaccaccac  
 tcccaaaaatggaccaggaccaaaaaactaaaactgcaggtccagatcaaacagaaatgact  
 attgaaggcttgacagccacagtgaggatgtgggttagtgctctatgctcagaatccaagcggag  
 agagtacgctcttccatcaaaaattgcttgggaaagccacaggggcaagtttccaggtacagg  
 gtgacctactcgagccctgaggatggaatccatgagctattccctgcacctgatggtgaagaag  
 aactgcagagctgcaaggcctcagaccgggttctgagtacacagtcagtggttgcttgccttgca  
 cgatgatatggagagccagcccctgattggaaccagtcacacagctattcctgcaccaactgac  
 ctgaagttcactcaggtcacaccsacaagcctgagcgcccagtgggacaccaccaatgttcagc  
 tcaactggatatcgagtgcgggtgaccccccaaggagaagaccggaccaatgaaagaaatcaacct  
 tgctcctgacagctcatccgtgggtgtatcaggacttatggtggccaccaaataatgaagtgagt  
 gtctatgctcttaaggacactttgacaagcagaccagctcagggagttgtcaccactctggaga  
 atgtcagatctcatcaccatcaccatcactaa

Нуклеотидную последовательность этого антигена амплифицировали методом ПЦР, используя праймеры, содержащие сайты рестрикции BamHI и BglII, соответственно, на 5'- и 3'-концах. Полученный в результате продукт ПЦР и вектор pQE12 (QIAGEN) были подвергнуты перевариванию под действием рестрикционной эндонуклеазы BamHI и BglII, а затем лигированию в реакции, содержащей отношение вставки к вектору, составляющее 3:1. Полученный в результате вектор секвенировали, чтобы подтвердить правильность последовательности.

Антиген был получен следующим образом:

Электрокомпетентные TG-1-клетки пре-культивировали в 10 мл 2TY, Amp, 1% глюкозы электропорировали в присутствии 1 мкл ДНК



Miniprep антигена 11A12. Затем пре-культуру разбавляли 1:100 (8 мл в 800 мл 2TY, Amp, 0,1% Glucose) и растили до оптической плотности OD 600 порядка 0,4-0,6, а затем в течение ночи индуцировали под действием IPTG. На следующий день клетки осаждали, а супернатант фильтровали (Millipore 0,22 мкм). После центрифугирования и осветления культурального бульона, 11A12 очищали на колонке Nitrap жидкостной хроматографии быстрого разрешения, FPLC. Никелевую (Ni)-колонку регенерировали следующим образом: колонку промывали 5 объемами колонки (CV) H<sub>2</sub>O, затем ее обрабатывали 3CV 0,5 М ЭДТА/0,2 М Tris, pH 8, чтобы смыть с колонки следы старого никеля. После этого колонку промывали 5CV H<sub>2</sub>O. Потом на колонку наносили 2CV 100 мМ NiSO<sub>4</sub>, а после этого колонку промывали несколькими объемами CV H<sub>2</sub>O. После этого колонку уравнивали 5CV лизирующего буфера (20 мМ имидазол/250 мМ NaCl/PBS pH 7,4). Клеточный лизат фильтровали (Millipore 0,45 мкм) и наносили на колонку (вручную). Затем колонку вновь возвращали в систему FPLC, и через нее пропускали лизирующий буфер до тех пор, пока не устанавливался стабильный (константный) UV-сигнал (приблизительно 3 CV). Затем запускали программу элюции: градиент от 0% до 100% элюирующего буфера (400 мМ имидазол/250 мМ NaCl/PBS pH 7,4) в 5CV. Фракции, содержащие элюированный антиген, собирали и диализовали в PBS в течение ночи.

#### **Экспрессия и очистка анти-ED-A-антител**

Анти-ED-A-антитела экспрессировали и подвергали очистке следующим образом: Электрокомпетентные TG-1-клетки пре-культивировали в 10 мл 2TY, Amp, 1% глюкозы электропорировали в присутствии 1 мкл ДНК Miniprep одного из анти-ED-A-антител. Затем пре-культуру разбавляли 1:100 (8 мл в 800 мл 2TY, Amp, 0,1% Glucose) и растили до оптической плотности OD 600 порядка 0,4-0,6, а затем в течение ночи индуцировали под действием IPTG. На следующий день клетки осаждали, а супернатант фильтровали (Millipore 0,22 мкм). scFv очищали на колонке с протеин А-сефарозой, и использовали триэтиленмин для элюции scFv с колонки. Фракции, содержащие scFv, диализовали в PBS в

течение ночи при 4°C. Фракции scFv были затем нанесены на колонку Супердекс-75, их смывали буфером PBS, протекающем со скоростью 0,5 мл/мин., и собирали фракции объемом по 0,25 мл. Мономерные фракции были использованы в ВІАcore-анализе.

#### **ВІАcore-анализ 1**

ВІАcore-чип промывали в течение ночи, со скоростью потока 5 мкл/мин., буфером HBS-EP, ВІАCORE, 0.01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,005% сурфактантом P20 (этот же самый буфер использовали и для анализа). Антиген (11A12) разбавляли до концентрации 50 мкг/мл в ацетатном буфере (pH 4,0), и COOH-группы на чипе активировали путем инъекции 50 мкл смеси N-гидрокси-сукцинимид (NHS) и этил-N-(диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC). 40 мкл антигена 11A12 наносили на чип путем инъекции, и остаточные свободные COOH-группы блокировали 30 мкл этаноламина. После фильтрации через фильтр с порами в 0,22 мкм, по 20 мкл индивидуального бактериального супернатанта наносили на чип, и в режиме реального времени производили мониторинг взаимодействия с антигеном.

#### **ВІАcore-анализ 2**

Значения  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  и  $K_D$  родительского анти-ED-A-антитела и анти-ED-A-антител B2, C5, D5, C8, F8, B7 и G9 оценивали, используя метод резонанса поверхностного плазмона. Чип уравнивали в течение ночи тем же самым буфером, который использовали и для анализа, со скоростью потока 5 мкл/мин. Всю процедуру покрытия осуществляли при этой скорости потока. Антиген 11A12 разбавляли 1:25 ацетатным буфером, pH 4,00 (предоставленным компанией ВІАCORE), до конечной концентрации 20 мкг/мл. Затем смешивали NHS и EDC, и 50 мкл смеси инъецировали для активации COOH-групп на чипе CMS. Затем следовала инъекция 40 мкл антигена (это происходило приблизительно в течение 40''). Затем инъецировали 30 мкл этаноламина, чтобы заблокировать реактивность возможных свободных COOH-групп.

Каждый образец анализировали при скорости потока 20 мкл/мин. 20 мкл неразбавленного мономерного белка (полученного

после гель-фильтрации) наносили путем инъекции. Время диссоциации составляло приблизительно 200''. Затем 10 мкл 10 мМ HCl наносили путем инъекции для регенерации чипа. Инъекцию мономерного белка повторяли при различных разведениях, т.е. после разведения 1:2 (в PBS) следовала регенерация под действием HCl. Затем производили третью инъекцию белка, при разведении 1:4, после чего вновь следовала регенерация под действием HCl. Значения  $K_{on}$ ,  $K_{off}$  и  $K_D$  для каждого анти-ED-A-антитела оценивали с помощью программного обеспечения BIAevaluation.

### Гистохимия

Чтобы проконтролировать успешность биотинилирования *in vivo*, осуществляли последующее окрашивание биотинилированных структур, как описано в литературе (Рубак et al. 2005). Делали срез (10 мкм) свежее-замороженных образцов, фиксировали ацетоном, последовательно инкубировали с комплексом стрептавидина: биотинилированной щелочной фосфатазы (Biospa, Milano, Italy) и с реагентом Fast-Red TP (Sigma) [в присутствии 1 мМ левамизола для ингибирования эндогенной щелочной фосфатазы], и производили контрастное докрасивание раствором гематоксилина (Sigma).

Иммуногистохимическое окрашивание scFv-антителами, несущими FLAG-метку, было осуществлено так, как описано выше (см., например, Brack et al. 2006). Вкратце, срезы инкубировали одновременно в присутствии фрагментов scFv (в конечной концентрации 2-10 мкг/мл) и моноклонального анти-Flag-антитела M2. Связанные антитела детектировали с помощью кроличьего антитела против мышинового иммуноглобулина (Dakocytomation, Glostrup, Denmark), а затем комплекса щелочной фосфатазы и мышинового моноклонального антитела против щелочной фосфатазы (Dakocytomation). Реагент Fast Red (Sigma) был использован в качестве субстрата фосфатазы, и производили контрастное докрасивание срезов раствором гематоксилина (Sigma).

Все срезы закрепляли с использованием Glycergel (Dakocytomation, Glostrup, Denmark) и изучали под микроскопом Axiovert S100 TV (Carl Zeiss, Feldbach, Швейцария) с

использованием программного обеспечения Axiovision software (Carl Zeiss).

#### **In vivo нацеливание анти-ED-A-антителом**

Родительское анти-ED-A-антитело scFv метили коммерчески доступным производным инфракрасного флюорофора Alexa Fluor 750, сукцинидидиловым эфиром карбоновой кислоты (Invitrogen), согласно рекомендуемой методике. Меченое антитело отделяли от непрореагировавшего красителя путем гель-фильтрации на колонке PD-10 (GE Healthcare). Уровень окрашивания, оцениваемый в соответствии с методикой окрашивания, рекомендуемой компанией Invitrogen, составлял 5 молекул красителя на одну молекулу антитела. Alexa 750-меченное родительское анти-ED-A-антитело scFv (в конечной концентрации 0,3 мг/мл) инъецировали (200 мкл/мышь, т.е. 60 мкг антитела/мышь) в хвостовую вену мышей Sv190 через 3 недели после инъекции опухолевых клеток F9DR. Мышинные органы извлекали через 6 часов после инъекции меченого антитела, и получали изображение с помощью самодельного устройства для визуализировали инфракрасной флуоресценции (Birchler et al. 1999), снабженного вольфрамовой галогеновой лампой, специальными для Alexa 750 фильтрами для спектров возбуждения и эмиссии, а также монохроматической CCD-камерой.

#### **Биораспределение димерного антитела F8**

Димерное антитело F8 содержит одинаковые VH- и VL-домены, как и анти-ED-A-антитело F8, например, как в используемом scFv-формате. Димерное антитело F8 и анти-ED-A-антитело scFv F8 имеют различные линкерные последовательности между VH- и VL-доменами. Аминокислотной последовательностью линкера димерного антитела F8 является GSSGG (SEQ ID NO: 28) (нуклеотидная последовательность: gggccagtgccggt [SEQ ID NO: 29]). Следовательно, последовательность линкера димерного антитела F8 насчитывает в длину пять аминокислот, в то время как в анти-ED-A-антителе scFv F8 длина линкера составляет 20 аминокислот (см. SEQ ID NO: 11). Сокращение длины линкера между VH- и VL-доменами означает, что межмолекулярное, а предпочтительно, внутримолекулярное спаривание VH- и VL-доменов, является предпочтительным. Следовательно, VL-домен одного полипептида F8

с большей вероятностью будет спариваться с VN-доменом другого полипептида F8, чем с VN-доменом того же самого полипептида F8.

Димерное антитело F8 экспрессировали в TG1-клетках *E. coli* следующим образом: ДНК, кодирующую димерное антитело F8, вводили в электрокомпетентные TG1-клетки *E. coli* методом электропорации. Подвергнутые электропорации клетки *E. coli* пре-культивировали в 10 мл среды 2YT, Amp, 1% глюкозы. Пре-культуру разбавляли 1:100 800 миллилитрами среды 2YT, Amp, 0,1% глюкозы, и культуру растили до оптической плотности OD 600 порядка 0,6. Затем экспрессию димерного антитела F8 индуцировали, используя 1 mM IPTG.

Экспрессированное димерное антитело F8 метили  $^{125}\text{I}$  следующим образом: 10 мкл стерильного PBS добавляли в пробирку с йодогеном (покрытую 50 мкл 0,1 мг/мл йодогена в хлороформе), затем добавляли 2 мкл  $^{125}\text{I}$ -натрий-йодида (~200 мкКи) и инкубировали при комнатной температуре (RT) в течение 5 мин.

Затем 400 мкл димерного антитела F8 при оптической плотности OD порядка 0,2 (~60 мкг) добавляли к пробирке с йодогеном, инкубировали при комнатной температуре в течение 25 мин. Эту смесь в разведении 1/100 собирали с целью определения радиоактивности, содержащейся в этой смеси (обозначается как "INPUT"). Потом меченое димерное антитело F8 наносили на колонку эксклюзионной хроматографии (PD10: Сефадекс G-25 M, GE Healthcare), с тем, чтобы отделить йодированное димерное антитело F8 от свободного йода. Измеряли радиоактивность йодированного димерного антитела F8, и вычисляли процент йода, включенного в димерное антитело F8 (CPM [импульсы в минуту] йодированного димерного антитела F8/CPM INPUT), составлявший от 30 до 40%.

Четырем мышам-носителям опухоли F9 давали раствор Люголя в течение 2 дней (600 мкл в 300 мл), чтобы блокировать щитовидную железу, и каждую из этих мышей внутривенно инъецировали 200 мкл йодированного димерного антитела F8 (приблизительно 5-8 мкг йодированного димерного антитела F8 [18 мкКи] на мышь). Через 24 часа мышей умерщвляли, а опухоль, печень, легкие, селезенку, сердце, почки, кишечник, хвост и кровь извлекали (в контексте

настоящего изобретения обобщенно обозначаются как мышинные "ткани") и использовали для подсчета радиоактивности. Уровень радиоактивности в каждом образце ткани измеряли на гамма-счетчике Perkin. "Выведение" рассчитывали путем деления процента инъецированной дозы (в СРМ) на вес этой ткани (в граммах) (% ID/г).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Идентификация по-разному экспрессированных белков и варианты сплайсинга

Химические методы протеомики на основе перфузии, используемые для сравнительного анализа доступных для этого белков в печени и в печеночных метастазах F9 (Terrana et al., 1987), изображены на фиг.1А. Эти опухоли порождают обширные очаги метастазирования на поверхности и внутри мышинной печени (фиг.1В). Под действием терминальной анемии мышей-опухоленосителей перфузировали 15 миллилитрами 1,8 мМ раствора сульфосукцинимидил-6- [биотин-амидо]гексаноата (1 мг/мл) в PBS, pH 7,4, обогащенного 10% декстраном-40 в качестве вещества, увеличивающего объем плазмы крови. Эта процедура, которая обычно длилась 10 минут, позволяла удалить кровь из всех органов главного круга кровообращения и произвести селективное биотинилирование доступных белков, как в просвете сосудов, так и на аблюминальной области кровеносных сосудов. Фактически в результате этой процедуры все кровеносные сосуды печеночных метастазов F9 оказываются эффективно и селективно окрашенными, как было подтверждено последующим гистохимическим окрашиванием конъюгатами стрептавидина со щелочной фосфатазой (фиг.1С). В нормальной печени кровеносные сосуды были окрашены сильно, но имело место также и включение метки некоторыми синусоидными капиллярами, сходное с физиологической фильтрующей функцией печени (фиг.1С). Биотинилирование *in vivo* гасилось в результате перфузирования раствором, содержащим первичные амины. Впоследствии образцы печеночных метастазов отделяли от печени, гомогенизировали и использовали для восстановления биотинилированных белков в присутствии сильного детергента ДСН путем аффинной хроматографии на стрептавидиновой смоле

(фиг.1А). Чтобы минимизировать риск, связанный с возможной диффузией белков в печени хозяина, печень, полученную из здоровых *in vivo* биотинилированных мышей, использовали для изучения кровеносных сосудов нормальной печени. Использование печени хозяина из мышей-носителей опухоли F9, тоже является проблематичным в силу того, что остается мало остаточной здоровой ткани, а также еще и потому, что на макроскопическом уровне трудно исключить наличие в ней микроскопических метастазов. В итоге для протеомного анализа были в общей сложности использованы образцы из 7 биотинилированных *in vivo* здоровых мышей и из 9 *in vivo* биотинилированных мышей-носителей опухоли F9. Кроме того, образцы из 2 здоровых и 3 небитинилированных мышей-носителей метастазов были использованы в качестве отрицательного контроля. В результате после проведения стадий интенсивного промывания и триптического переваривания на смоле стрептавидин-связанных белков из метастазов F9 и нормальной печени (полученных параллельно) была получена коллекция пептидов, которые можно было отделить, идентифицировать и сравнить, используя методы нано-ВЭЖХ и MALDI-TOF/TOF- масс-спектрометрии (Roesli et al., 2006).

В итоге в общей сложности было идентифицировано различных пептидов в количестве 1291 (уровень значимости, по Mascot, составляет >95%), и эти пептиды были сгруппированы с помощью системы программного обеспечения Mascot в 480 наборов разных пептидов. Несколько из этих пептидных наборов было обнаружено также и в образцах отрицательного контроля, полученных из небитинилированных мышей (наподобие карбоксилаз, которые несут эндогенный биотин в качестве кофактора, кератины в качестве примесей или же белки, представленные в большом избытке, такие как сывороточный альбумин). Из оставшихся 435 идентифицированных пептидных наборов 331 набор можно было однозначно отнести, на основании анализа с использованием системы программного обеспечения Mascot, к одному белку, тогда как 104 пептидных набора было отнесено к множественным (всего до 358) белкам. В большинстве случаев множественные белки, отнесенные к одному и тому же пептидному набору, принадлежат

семейству родственных белков (например, иммуноглобулины) или даже могут относиться к одинаковым белкам с различными входными записями в базе данных. Из 435 разных пептидных наборов 117 были обнаружены исключительно в образцах с метастазами, 193 – только в образцах здоровой печени, и 125 – в обоих типах тканей. Например, пептиды, соответствующие фибронектину (номер доступа P11276 в Национальном Центре Биотехнологической Информации [NCBI]), были обнаружены в четырех образцах здоровой печени и восьми образцах с метастазами.

Белки, обнаруженные как в образцах здоровой печени, так и в образцах с метастазами (например, фибронектин), могут присутствовать в этих двух разных типах образцов в существенно отличающихся количествах. В противном случае это должно отражаться на количестве образцов, в которых эти белки были детектированы, и/или на количестве пептидов (также как и на нормализованной интенсивности пептидных сигналов; (Scheurer et al. 2005, Scheurer et al. 2005)), наблюдаемых в образцах печени и метастазов. Например, 38 триптических пептидов фибронектина (номер доступа P11276 в NCBI) было обнаружено только в образцах с метастазами, тогда как один пептид был обнаружен только в образцах здоровой печени. Одиннадцать пептидов было обнаружено в образцах обоих типов.

Исключительное изобилие полученных из фибронектина пептидов, обнаруженных в печеночных метастазах, несмотря на тот факт, что печень является местом биосинтеза фибронектина, побудило авторов изобретения изучить различия в относительной степени изобилия пептидов и избыточной экспрессии доменов, полученных в результате альтернативного сплайсинга. В таблице 1 перечислены все фибронектиновые пептиды, идентифицированные методами протеомики. Мышиный фибронектин содержит два глобулярных экстра-домена типа III, которые могут подвергаться альтернативному сплайсингу: ED-A и ED-B (French-Constant 1995, Hynes 1990, Kaspar et al. 2006). Кроме того, у мышей и человека сегмент IIICS подвергается разным схемам сплайсинга. Интересно то, что все три полученных из ED-A пептида, также как и пептиды, полученные из сегмента IIICS, были обнаружены только в



опухолевых образцах.

Пептиды, полученные из ED-B, не должны быть видимы при этом анализе, поскольку ED-B не содержит лизиновых остатков, а два аргинина служат причиной того, что образующиеся пептиды имеют слишком большой размер для того, чтобы их можно было детектировать. На фиг.2А на основе структуры фибронектиновых доменов показана локализация пептидов, идентифицированных в опухолевых образцах (Опухоль) и в образцах здоровой печени (Норма). На фиг.2В показана относительная интенсивность нормализованных MS-сигналов для двух пептидов-производных фибронектина: пептид IAWESPQGQVSR (SEQ ID NO: 16), который локализован внутри ED-A-домена, и пептид FLTTTPNSLLVSWQAPR (SEQ ID NO: 15), который локализован в домене 14. Последний пептид в большем количестве представлен в образцах с метастазами, но при этом он четко детектировался также и в эквивалентных образцах нормальной печени. В отличие от этого, производные пептидов ED-A-домена, дают четкие сигналы в областях метастазирования, но совсем не детектируются в нормальной печени (т.е. интенсивность сигнала ослаблена более чем в 100 раз).

#### **Иммуногистохимия**

Наиболее разительные различия между печеночными структурами и метастатическими новообразованными сосудами наблюдались на уровне ED-A- и ED-B-доменов фибронектина. В случае обоих доменов наблюдалось сильное и специфическое окрашивание метастатических кровеносных сосудов, тогда как в нормальной печени и фактически во всех нормальных органах (за исключением эндометрия в пролиферативной фазе и некоторых сосудов яичников) ответ всех иммуногистохимических анализов был отрицательным (фиг.3А). Важно также и то, что была обнаружена выраженная экспрессия ED-A в новообразованных сосудах в легочных метастазах и в печеночных метастазах у человека (фиг.4).

#### **Нацеливание in vivo**

Для того чтобы проверить применимость ED-A в качестве мишени при лиганд-связанном нацеливании на метастазы, был предпринят эксперимент по нацеливанию in vivo с использованием

метода визуализации флуоресценции в ближней инфракрасной области спектра. Родительское антитело метили флюорофором Alexa Fluor 750 и внутривенно инъецировали мышам-носителям метастазов F9. На извлеченных органах методом визуализации флуоресценции в ближней инфракрасной области спектра было продемонстрировано выраженное накопление вещества направленного действия в областях образования метастазов (фиг.3В).

### **Селекция анти-ED-A-антител**

#### **ВIAcore-анализ 1**

В результате проведения ВIAcore-анализа получали график для каждого анти-ED-A-антитела, из которого путем анализа выводили уровень аффинности антитела в отношении конкретного антигена следующим образом: ось X на каждом графике соответствует времени, а ось Y соответствует резонансным единицам (Resonance Units, величина, которая характеризует аффинность связывания тестируемым антителом антигена, нанесенного на ВIAcore-чип). На каждом графике обнаруживалось 3 пика и 1 минимум, которые соответствуют сменам буфера и, следовательно, никакого отношения к интерпретации полученных результатов не имеют.

Восходящая часть кривой на каждом графике соответствует ассоциативной фазе. Чем отвеснее (круче) кривая в этой части графика, тем быстрее происходит ассоциация антитела с антигеном. Нисходящая часть каждого графика соответствует фазе диссоциации комплекса антиген-антитело. Чем кривая в этой части графика более пологая, тем медленнее диссоциация комплекса антиген-антитело.

Все анти-ED-A-антитела H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 и G9 давали более пологую кривую диссоциации, чем родительское анти-ED-A-антитело, из которого были получены указанные антитела, что указывает на то, что они связываются с ED-A, а следовательно, также и с A-FH, с большей аффинностью, чем родительское анти-ED-A-антитело. Графики, полученные для антител E5, F1, F8 и H1, соответствуют наиболее пологим кривым диссоциации из всех тестируемых в настоящем изобретении анти-ED-A-антител. Кривые ассоциации антител H1, C5, D5, E5, C8, F8

и F1 были более пологими, чем кривые, соответствующие родительскому анти-ED-A-антителу, тогда как кривые ассоциации, наблюдаемые в случае антител B2, B7, E8 и G9, оказались столь же крутыми, сколь и кривые ассоциации, наблюдаемые в случае родительского анти-ED-A-антитела. Однако поскольку для VIAcore-анализа антител H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 и G9 были использованы бактериальные супернатанты IPTG-индуцированных TG-1-клеток *E. coli*, концентрация антител в тестируемых образцах была неизвестна, но она, вероятнее всего, была ниже, чем концентрация родительского анти-ED-A-антитела, используемого для сравнения. Следовательно, кривые ассоциации антител H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 и G9 могли оказаться искусственно занижены из-за низких концентраций антител в образцах, используемых в VIAcore-анализе. Однако поскольку в VIAcore-анализе концентрация незначительно влияет на процесс диссоциации антитела от его антигена-мишени, пологие кривые диссоциации, наблюдаемые в случае антител H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 и G9, показывают, что эти антитела связываются с ED-A по меньшей мере с равной, а вероятно, и с большей аффинностью, нежели родительское анти-ED-A-антитело. Следовательно, с очень большой вероятностью, анти-ED-A-антитела H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 и G9 дадут такие же или даже лучшие результаты, чем родительское анти-ED-A-антитело, если их использовать в одних и тех же исследованиях *in vivo* и иммуногистохимических исследованиях, проводимых, как в настоящем изобретении уже было описано, с использованием родительского анти-ED-A-антитела. Следовательно, данные, полученные при исследованиях *in vivo* и иммуногистохимических исследованиях с использованием родительского анти-ED-A-антитела, доказывают, что анти-ED-A-антитела H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 и G9 могут быть использованы для лечения опухолевых метастазов.

## **VIAcore-анализ 2**

Значения  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  и  $K_D$  для каждого анти-ED-A-антитела оценивали с помощью программного обеспечения VIAevaluation. Значения  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  и  $K_D$  родительского анти-ED-A-антитела и анти-

ED-A-антител В2, С5, D5, С8, F8, В7 и G9 в отношении антигена 11A12 подробно представлены в таблице 3. Все анти-ED-A-антитела В2, С5, D5, С8, F8, В7 и G9 имеют лучшие показатели  $K_D$  в отношении антигена 11A12 по сравнению с родительским анти-ED-A-антителом, из которого они получены, и это свидетельствует о том, что они связываются с ED-A, а следовательно, также и с А-FN, с большей аффинностью, чем родительское анти-ED-A-антитело. Следовательно, можно сделать заключение, что, анти-ED-A-антитела Н1, В2, С5, D5, E5, С8, F8, F1, В7, E8 и G9 с исключительно большой вероятностью дадут такие же или даже лучшие результаты, чем родительское анти-ED-A-антитело, если их использовать в одних и тех же исследованиях *in vivo* и иммуногистохимических исследованиях, проводимых, как в настоящем изобретении уже было описано, с использованием родительского анти-ED-A-антитела. Следовательно, данные, полученные при исследованиях *in vivo* и иммуногистохимических исследованиях с использованием родительского анти-ED-A-антитела, являются доказательством того, что анти-ED-A-антитела В2, С5, D5, E5, С8, F8, В7 и G9 могут быть использованы для лечения опухолевых метастазов.

#### **Биораспределение димерного антитела F8**

Процент от инъецированной дозы (ID)  $I^{125}$ -меченного (йодированного) димерного антитела F8, определяемый на грамм (г) мышинной ткани, был очень сходным для печени, легких, селезенки, сердца, почек, кишечника, хвоста и крови, и во всех этих тканях, за исключением почечной, он составлял менее 2% ID/г (фиг.8). В противоположность этому, опухоли F9 содержали в среднем приблизительно в четыре раза больший процент ID, чем любая другая из мышинных тканей, которые были подвергнуты анализу (фиг.8). Это свидетельствует о том, что димерное антитело F8 было выборочно нацелено на мышинные опухоли. Процент ID, который был детектирован в остальных тканях, скорее всего, представляет собой фоновый уровень димерного антитела F8, присутствующий в организме мышей, или неспецифическое окрашивание остальных мышинных тканей. Как указано в настоящем описании, эксперименты по биораспределению были проведены на

четырёх мышах, и хотя процент ID, детектируемый на мышиную ткань, варьировал (см. пределы разброса ошибок на фиг.8), процент димерного антитела F8, детектируемый в опухолях F9, был существенно выше, чем в любой из остальных тестируемых мышинных тканей.

Исследование биораспределения проводили на первичных опухолях F9, и полученные результаты показали, что анти-ED-A-антитела согласно настоящему изобретению были избирательно нацелены на опухолевую ткань *in vivo*. Эти результаты являются дополнительным свидетельством в пользу того, что анти-ED-A-антитела согласно изобретению, как уже было отмечено в настоящем описании, могут быть использованы для достижения таких же или же лучших результатов, при их использовании в рамках одного и того же исследования *in vivo* и иммуногистологического исследования, чем результаты, полученные при использовании родительского анти-ED-A-антитела.

#### Секвенирование

Все анти-ED-A-антитела H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 и G9 являются scFv-антителами, и они были секвенированы с использованием стандартных методов. Нуклеотидная последовательность анти-ED-A-антитела H1 представлена на фиг.6. Аминокислотная последовательность анти-ED-A-антитела H1 представлена на фиг.7.

Предпочтительные нуклеотидные последовательности, кодирующие VH- и/или VL-домены анти-ED-A-антител B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 и G9, идентичны нуклеотидным последовательностям, кодирующим VH- и/или VL-домены анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что нуклеотидные последовательности, кодирующие области CDR1 легкой (VL) и тяжелой (VH) цепи антитела H1, заменены перечисленными в таблице 2 нуклеотидными последовательностями, кодирующими области CDR1 легкой (VL) и тяжелой (VH) цепи соответствующего антитела.

Некоторые предпочтительные нуклеотидные последовательности, кодирующие VH- и/или VL-домены анти-ED-A-димерного антитела F8, идентичны нуклеотидным

последовательностям, кодирующим VH- и/или VL-домены анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что нуклеотидные последовательности, кодирующие области CDR1 легкой (VL) и тяжелой (VH) цепи антитела H1, заменены перечисленными в таблице 2 нуклеотидными последовательностями, кодирующими области CDR1 легкой (VL) и тяжелой (VH) цепи анти-ED-A-димерного антитела F8. Предпочтительной нуклеотидной последовательностью, кодирующей линкер, соединяющий VH- и VL-домены анти-ED-A-димерного антитела F8, является последовательность ggggtccagtggcggt (SEQ ID NO: 29).

Анти-ED-A-антитела B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 и G9 имеют аминокислотные последовательности, идентичные аминокислотным последовательностям анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что аминокислотные последовательности областей CDR1 легкой (VL) и тяжелой (VH) цепи антитела H1 заменены перечисленными в таблице 2 аминокислотными последовательностями областей CDR1 легкой (VL) и тяжелой (VH) цепи соответствующего антитела. Аминокислотные последовательности VH- и VL-доменов анти-ED-A-димерного антитела F8 идентичны аминокислотным последовательностям анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что аминокислотные последовательности областей CDR1 легкой (VL) и тяжелой (VH) цепи антитела H1 заменены перечисленными в таблице 2 аминокислотными последовательностями областей CDR1 легкой (VL) и тяжелой (VH) цепи анти-ED-A-антитела F8, а аминокислотная последовательность линкера в антителе H1 заменена линкерной аминокислотной последовательностью GSSGG (SEQ ID NO: 28).

Аминокислотная последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела B2 (SEQ ID NO: 21) идентична аминокислотной последовательности VH-домена анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что VH-домен анти-ED-A-антитела H1 заменен последовательностью SEQ ID NO: 23.

Аминокислотная последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела C5 (SEQ ID NO: 41) идентична аминокислотной последовательности VH-домена анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что CDR1-область VH-домена анти-ED-A-антитела

H1 заменена последовательностью SEQ ID NO: 43.

Аминокислотная последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела D5 (SEQ ID NO: 51) идентична аминокислотной последовательности VH-домена анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что CDR1-область VH-домена антитела H1 заменена последовательностью SEQ ID NO: 53.

Аминокислотная последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела E5 (SEQ ID NO: 61) идентична аминокислотной последовательности VH-домена анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что CDR1-область VH-домена антитела H1 заменена последовательностью SEQ ID NO: 63.

Аминокислотная последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела C8 (SEQ ID NO: 71) идентична аминокислотной последовательности VH-домена анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что CDR1-область VH-домена антитела H1 заменена последовательностью SEQ ID NO: 73.

Аминокислотная последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела F8 (SEQ ID NO: 81) идентична аминокислотной последовательности VH-домена анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что CDR1-область VH-домена антитела H1 заменена в нем последовательностью SEQ ID NO: 83. VH-домены анти-ED-A-димерного антитела F8 имеют ту же самую аминокислотную последовательность, что и VH-домен анти-ED-A-антитела scFv F8 (т.е. SEQ ID NO: 81).

Аминокислотная последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела F1 (SEQ ID NO: 91) идентична аминокислотной последовательности VH-домена анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что CDR1-область VH-домена антитела H1 заменена последовательностью SEQ ID NO: 93.

Аминокислотная последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела B7 (SEQ ID NO: 101) идентична аминокислотной последовательности VH-домена анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что CDR1-область VH-домена антитела H1 заменена последовательностью SEQ ID NO: 103.

Аминокислотная последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела E8 (SEQ ID NO: 111) идентична аминокислотной

последовательности VH-домена анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что CDR1-область VH-домена антитела H1 заменена последовательностью SEQ ID NO: 113.

Аминокислотная последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела G9 (SEQ ID NO: 31) идентична аминокислотной последовательности VH-домена анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что CDR1-область VH-домена антитела H1 заменена последовательностью SEQ ID NO: 33.

Аминокислотная последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела B2 (SEQ ID NO: 22) идентична аминокислотной последовательности VL-домена анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что CDR1-область VL-домена антитела H1 заменена последовательностью SEQ ID NO: 26.

Аминокислотная последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела C5 (SEQ ID NO: 42) идентична аминокислотной последовательности VL-домена анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что CDR1-область VL-домена антитела H1 заменена последовательностью SEQ ID NO: 46.

Аминокислотная последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела D5 (SEQ ID NO: 52) идентична аминокислотной последовательности VL-домена анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что CDR1-область VL-домена антитела H1 заменена последовательностью SEQ ID NO: 56.

Аминокислотная последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела E5 (SEQ ID NO: 62) идентична аминокислотной последовательности VL-домена анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что CDR1-область VL-домена антитела H1 заменена последовательностью SEQ ID NO: 66.

Аминокислотная последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела C8 (SEQ ID NO: 72) идентична аминокислотной последовательности VL-домена анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что CDR1-область VL-домена антитела H1 заменена последовательностью SEQ ID NO: 76.

Аминокислотная последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела F8 (SEQ ID NO: 82) идентична аминокислотной последовательности VL-домена анти-ED-A-антитела H1, за



исключением того, что CDR1-область VL-домена антитела H1 заменена последовательностью SEQ ID NO: 86. VL-домены анти-ED-A-димерного антитела F8 имеют ту же самую аминокислотную последовательность, что и VL-домен анти-ED-A-антитела F8 (т.е. SEQ ID NO: 82).

Аминокислотная последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела F1 (SEQ ID NO: 92) идентична аминокислотной последовательности VL-домена анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что CDR1-область VL-домена антитела H1 заменена последовательностью SEQ ID NO: 96.

Аминокислотная последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела B7 (SEQ ID NO: 102) идентична аминокислотной последовательности VL-домена анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что CDR1-область VL-домена антитела H1 заменена последовательностью SEQ ID NO: 106.

Аминокислотная последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела E8 (SEQ ID NO: 112) идентична аминокислотной последовательности VL-домена анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что CDR1-область VL-домена антитела H1 заменена последовательностью SEQ ID 116.

Аминокислотная последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела G9 (SEQ ID NO: 32) идентична аминокислотной последовательности VL-домена анти-ED-A-антитела H1, за исключением того, что CDR1-область VL-домена антитела H1 заменена последовательностью SEQ ID NO: 36.

Хоть и необязательно, но аминокислота в 5-ом положении VH-домена анти-ED-A-антител H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8, G9 может быть лейциновым остатком (L), а не валиновым остатком (V), как показано на фиг.7А. Помимо этого, или альтернативно, аминокислота в 18-ом положении VL-домена анти-ED-A-антител H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8, G9 может быть аргининовым остатком (R), а не лизиновым остатком (K), как показано на фиг.7С.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Все ссылки, повсеместно используемые в настоящем описании, включая и те, которые были цитированы выше, во всей полноте включены в настоящее описание.

Amit et al. (1986), *Science*, 233: 747-753.

Andersen et al. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13: 117.

Ausubel et al. (1999) 4th eds., *Short Protocols in Molecular Biology - A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons.

Bagshawe K. D, et al. (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4: 915-922.

Balza et al. (1988), *FEBS Lett.*, 228: 42-44.

Birchler et al. (1999), *J. Immunol. Methods*, 231, 239-248.

Bird et al. (1988) *Science*, 242, 423-426.

Borsi et al. (1987), *J. Cell. Biol.*, 104, 595-600.

Borsi et al. (1990), *FEBS Lett.*, 261: 175-178.

Borsi et al. (1995), *J. Biol. Chem.*, 270: 6243-6245.

Borsi et al. (1998), *Exp. Cell Res.*, 240, 244-251.

Brack et al. (2006), *Clin. Cancer Res.*, 12, 3200-3208.

Carnemolla et al. (1989), *J. Cell. Biol.*, 108: 1139-1148.

Caton et al. (1990), *J. Immunol.*, 144: 1965-1968.

Chadd et al. (2001), *Current Opinion in Biotechnology* 12: 188-194.

Chothia et al. (1987), *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917.

Chothia et al. (1989), *nature*, 342: 877-883.

Devos et al. (1983), *Nucl. Acids Res.* 11: 4307-4323.

Ffrench-Constant (1995), *Exp. Cell Res.*, 221, 261-271.

Giovannoni, *Nucleic Acid Research*, 2001, 29(5):E 27.

Glennie M. J. et al., 1987 *J. Immunol.* 139, 2367-2375.

Haan et al. (2004), *BioCentury*, 12(5): A1-A6.

Hanahan et al. (2000), *Cell* 200, 57-70.

Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor.

Kornblihtt et al. (1984), *Nucleic Acids Res.* 12, 5853-5868.

- Laboratory, Cold Spring Harbor N. Y., pp. 726, 1988.
- Heikmheimo et al. (1991), *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, 61, 101-109.
- Holliger and Bohlen 1999 *Cancer and metastasis rev.* 18: 411-419.
- Holliger et al. (1993a), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6444-6448.
- Holliger et al. (1993b), *Current Opinion Biotechnol* 4, 446-449.
- Holt et al. (2003) *Trends in Biotechnology* 21, 484-490.
- Hoogenboom et al. (1991), *Nucleic Acids Res.*, 19 (15) 4133-7.
- Hu et al. (1996), *Cancer Res.*, 56, 3055-3061.
- Huston et al. (1988) *PIIAS USA*, 85, 5879-5883.
- Hynes, P.O. (1990). *Fibronectins* (New York: Springer-Verlag).
- Jacobs et al. (2002), *Hum. Pathol.*, 33, 29-38.
- Kabat et al. (1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 4th Edition. US Department of Health and Human Services.
- Kabat et al. (1991a), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Edition. US Department of Health and Human Services, Public Service, MIH, Washington, (a)
- Kabat et al. (1991b), *J. Immunol.*, 147: 1709-1719.
- Kaspar et al. (2006), *Int. J. Cancer*, 118, 1331-1339.
- Knappik et al., (2000) *J. Mol. Biol.* 296, 57-86.
- Kohler and Milstein, *Nature*, 256: 495-497, 1975.
- Koide et al. (1998), *Journal of Molecular Biology*, 284: 1141-1151.
- Kontermann et al. (2001), *S, Antibody Engineering*, Springer-Verlag. New York, LLC; ISBN: 3540413545.
- Koukoulis et al. (1993), *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 25, 285-295.
- Koukoulis et al. (1995), *Ultrastruct. Pathol.*, 19, 37-43.
- Krebs et al. (2001), *Journal of Immunological Methods*, 254 67-84.

Larrick JW and Thomas DW (2001) Current Opinion in Biotechnology 12: 411-418.

Ledermann J. A. et al., (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664.

Lohi et al. (1995), Int. J. Cancer, 63, 442-449.

MaED-A et al. (1983) Biochem. Biophys. Res, COMM. 115: 1040-1047.

Matsumoto et al. (1999), Jpn. J. Cancer Res., 90, 320-325.

McCafferty et al., (1990) Nature, 348, 552-554.

Mendez, M. et al., (1997) Nature Genet, 15(2): 146-156.

Merchand et al., 1998. Nature Biotech. 16: 677-681.

Men, D., and Bicknell, R. (2005), Nat Rev Cancer 5, 436-446.

Nygren et al. (1997), Current Opinion in Structural Biology, 7: 463-469.

Oyama et al. (1989), J. Biol. Chem., 264, 10331-10334.

Paolella et al. (1988), Nucleic Acids Res. 16, 3545-3557.

Pini et al. (1998), J. Biol. Chem., 273, 21769-21776.

Plückthun (1991), Bio/Technology 9: 545-551.

Peiter et al. (1996), Nature Biotech, 14, 1239-1245.

Pepp et al., 1995 J. Hemat. 377-382.

Ridgeway et al. (1996), Protein Eng., 9, 616-621.

Robinson ed., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Roesli et al. (2006), Nature Protocols, 1, 192-199.

Ruf et al. (1991) J. Biol. Chem. 226: 15719-15725.

Rybak et al. (2005), Nat. Methods, 2, 291-298.

Rybak et al. (2006), ChemmedChem., 2, 22-40.

Sambrook and Russell, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3rd edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Scarpati et al. (1987) Biochemistry 26: 5234-5238.

Scarpino et al. (1999) J. Pathol. 188, 163-167.

Scheurer et al., (2005), Proteomics 5, 3035-3039.

Segal et al. (1974), PNAS, 71: 4298-4302.

Sharon et al. (1990a), PNAS, 87: 4814-4817.

Sharon et al. (1990b), J. Immunol., 144: 4863-4869.

Silacci et al. (2003), Proteomics, 5, 2340-2350.

- Staerz U.D. and Bevan M.J. 1986 PNAS 83.
- Suresh et al., 1986 Method Enzymol. 121: 210-228.
- Taniguchi et al. (1983) Nature 302, 305-310.
- Tavian et al. (1994), Int. J. Cancer, 56, 820-825.
- Terrana et al. (1987), Cancer Res. 47, 3791-3797.
- Thorpe (2004), Clin. Cancer Res., 10, 415-427.
- Trachsel et al. (2006), Adv. Drug Deliv. Rev., 58, 735-754.
- Viti et al. (2000), Methods Enzymol., 326, 480-505.
- Ward et al. (1989), Nature 341, 544-546.
- Wess. In: BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1-A7, 2004.

Фибронектиновые пептиды, идентифицируемые в  
нормальной печени и/или в метастазах

Пептидная последовательность	Положение в последовательности		1Печень Всего 6	1Метастазы (Всего 8)
	Начало	Конец		
HYQINQQWER	59	68		6
VGDTYERPK	109	117		4
HALQSASAGSGSFTDVR	274	290		7
IGDQWDK	480	486		1
TFYQIGDSWEK	568	578	1	
WKEATIPGHLNSYTIK	654	669		2
EATIPGHLNSYTIK	656	669		1
GLTPGVIYEGQLISIQQYGHR	670	690		7
WSRPQAPITGYR	830	841	2	3
SDNVPPPTDLQFVELTDVK	903	921		3
VTIMWTPPDSVVSgyr	922	937		8
VEVLPVSLPGEHGQR	938	952		8
NTFABITGLSPGVTYLfk	958	975		7
VFAVHQGR	976	983		7
TVLVTWTPPR	1011	1020	2	8
QYNVGLASK	1040	1049		4
NLQPGSEYTVTLVAVK	1054	1069		6
ATGVFTTLQPLR	1077	1088	1	8
LGVRPSQGGEAPR	1116	1128		7
VVTPLSPPTNLHLEANPDTGVLTVSWER	1169	1196		3
STTPDITGYR	1197	1206		7
VTWAPPSIELTNLLVR	1375	1391	2	7
TGLDSPTGFDSSDITANSFTVHWWVAPR	1446	1472		4
APITGYIIR	1473	1481	1	8
HHAHESVGRPR	1482	1492		1
EESPLIGQQATVSDIPR	1525	1542		8
ITYGETGGNSPVQEFVPGSK	1570	1590	2	8
SPVQEFVPGSK	1579	1590		6
STATINNIKPGADYTITLYAVTGR	1591	1614		5
GDSPASSKPVSYNYK	1615	1629		4
TEIDKPSQMQVTDVQDNSISVR	1630	1651		8
WLPSTSPVTGYR	1652	1663		7
TASPDQTEMTIEGLQPTVEYVVSVYAQNR	1679	1707		7
<sup>2</sup> NGESQPLVQTAVTIIPAPTNLK	1708	1819		3
<sup>3</sup> NGESQPLVQTAVTNIDRPK	1708	1726		1
<sup>3</sup> IAWESPQQQVSR	1740	1751		8
<sup>3</sup> VTYSSPEDGIR	1754	1764		1
FSQVTPTSFTAQWIAPSVQLTGYR	1820	1843	1	5
YEVSVYALK	1878	1886		2
TKTETITGFQVDAIPANGQTPVQR	1926	1949	1	2
TETITGFQVDAIPANGQTPVQR	1928	1949		3
SYTITGLQPGTDYK	1957	1970		7
IHLTYLNDNAR	1971	1981		7

SSPVIIDASTAIDAPSNLR	1982	2000	3	8
FLTTTFNSLLVSWQAPR	2001	2017	4	5
ITGYIIK	2020	2026		5
YEKFGSPPR	2027	2035		6
<sup>1</sup> PYLPNVDEEVQIGHVPR	2165	2181		7
GVTYNIIVEALQNQR	2355	2269	4	7
RFGAAEPSPDGTGHTYNQYTQR	2425	2447		2

<sup>1</sup> Цифрами указано то, у сколько животных из 6 здоровых биотинилированных *in vivo* мышей или из 8 биотинилированных *in vivo* мышей-носителей метастазов был идентифицирован конкретный пептид в соответствующих образцах тканей. Здесь перечислены все пептиды, которые отмечены, согласно программному обеспечению Mascot, в базе данных по фибронектину регистрационными номерами P11276, Q3UHL6 или Q3TCSF1.

<sup>2</sup> Этот пептид покрывает часть последовательности фибронектина, расположенной до и после ED-A-домена, что свидетельствует о наличии изоформы (EDA-) фибронектина.

<sup>3</sup> Эти пептиды соответствуют последовательности ED-A-домена (положениям 1721-1810 в этой последовательности).

<sup>4</sup> Этот пептид соответствует последовательности шарнирного участка IIICS (положениям 2082-2201 в этой последовательности).

Таблица 2

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности участков тяжелой цепи и легкой (VL) цепи анти-ED-A-антител со зрелой аффинностью

Антитело	CDR1 (VH)	CDR1 (VL)
H1	CCG CGG AGG P R R (SEQ ID NO: 3)	TCT GCG TGG S A W (SEQ ID NO: 6)
B2	GCG GCT AAG A A K (SEQ ID NO: 23)	GTG GCT TTT V A F (SEQ ID NO: 26)
C5	CCG ATT ACT P I T (SEQ ID NO: 43)	TTG CAT TTT L H F (SEQ ID NO: 46)
D5	GTG ATG AAG V M K (SEQ ID NO: 53)	AAT GCT TTT N A F (SEQ ID NO: 56)
E5	ACT GGT TCT T G S (SEQ ID NO: 63)	CTT GCG CAT L A H (SEQ ID NO: 66)
C8	CTT CAG ACT L Q T (SEQ ID NO: 73)	CTT CCT TTT L P F (SEQ ID NO: 76)
F8	CTG TTT ACG L F T (SEQ ID NO: 83)	ATG CCG TTT M P F (SEQ ID NO: 86)
F1	TAG GCG CGT Q(Amber) A R (SEQ ID NO: 93)	GCG CCT TTT A P F (SEQ ID NO: 96)
B7	CAT TTT GAT H F D (SEQ ID NO: 103)	CTG GCT TTT L A F (SEQ ID NO: 106)
E8	GAT ATG CAT D M H (SEQ ID NO: 113)	TCG TCT TTT S S F (SEQ ID NO: 116)
G9	CAT ATG CAG H M Q (SEQ ID NO: 33)	ACT GCT TTT T A F (SEQ ID NO: 36)

Таблица 3

Данные, полученные согласно оценке путем ВІАscore-анализа

Антитело	$k_{on}$ (1/Мв)	$k_{off}$ (1/с)	$K_D$ (М)
Родительское анти-ED-A-антитело	$2.5 \times 10^5$	0.02	$\sim 1 \times 10^{-7}$
B2	$3.8 \times 10^5$	$7.54 \times 10^{-3}$	$\sim 2 \times 10^{-8}$
C5	$3.04 \times 10^5$	$9.23 \times 10^{-3}$	$\sim 3 \times 10^{-8}$
D5	$4.53 \times 10^5$	$7.6 \times 10^{-3}$	$\sim 1.7 \times 10^{-8}$
C8	$3.8 \times 10^5$	$5.3 \times 10^{-3}$	$\sim 1.4 \times 10^{-8}$
F8	$4.65 \times 10^5$	$1.4 \times 10^{-3}$	$\sim 3.1 \times 10^{-9}$
B7	$2.67 \times 10^5$	$4.5 \times 10^{-3}$	$\sim 1.68 \times 10^{-8}$
G9	$3.6 \times 10^5$	$7.54 \times 10^{-3}$	$\sim 2.09 \times 10^{-8}$



## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Philogen S.p.A.  
 Neri, Dario  
 Rybak, Jascha  
 Roesli, Christoph  
 Villa, Alessandra  
 Neri, Giovanni

<120> НОВЫЙ АНТИГЕН, АССОЦИИРОВАННЫЙ С НОВООБРАЗОВАННЫМИ  
 СОСУДАМИ ОПУХОЛЕВЫХ МЕТАСТАЗОВ

<130> SMWFP6530604

<150> US 60/909,580  
 <151> 2007-04-02

<150> US 60/948,564  
 <151> 2007-07-09

<160> 193

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
 <211> 118  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
 последовательность тяжелой цепи (VH) анти-ED-A-антитела H1

<400> 1

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 Thr Phe Ser Pro Arg  
 20 25 30

Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 2  
 <211> 125  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
 последовательность легкой цепи (VL) анти-ED-A-антитела H1

&lt;400&gt; 2

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala  
           20                   25                   30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
           85                   90                   95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
       115                   120                   125

<210> 3  
 <211> 3  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
 последовательность CDR1 тяжелой цепи анти-ED-A-антитела H1

&lt;400&gt; 3

Pro Arg Arg  
 1

<210> 4  
 <211> 6  
 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность CDR2 тяжелой цепи анти-ED-A-антитела H1

<400> 4

Ser Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 5

<211> 6

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность CDR3 тяжелой цепи анти-ED-A-антитела H1

<400> 5

Ser Thr His Leu Tyr Leu

1 5

<210> 6

<211> 3

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность CDR1 легкой цепи анти-ED-A-антитела H1

<400> 6

Ser Ala Trp

1

<210> 7

<211> 7

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность CDR2 легкой цепи анти-ED-A-антитела

<400> 7

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 8

<211> 6

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная

последовательность CDR3 легкой цепи анти-ED-A-антитела H1

<400> 8

Met Arg Gly Arg Pro Pro  
1 5

<210> 9

<400> 9  
000

<210> 10

<400> 10  
000

<210> 11

<211> 20

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность линкерной последовательности  
анти-ED-A-антитела H1

<400> 11

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser  
20

<210> 12

<211> 354

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: нуклеотидная  
последовательность тяжелой цепи (VH) анти-ED-A-антитела H1

<400> 12

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggct cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc ccgcggagga tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtg gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagtact 300

catttgatc tttttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc gagt 354

<210> 13

<211> 387

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: нуклеотидная последовательность легкой цепи (VL) анти-ED-A-антитела H1

<400> 13

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccagggcacc ctgtctttgt ctccagggga aaaagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagtgtttagc tctgcgtggt tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagatgcgtg gtcggccgcc gacgttcggc      300
caagggacca aggtggaaat caaagcggcc gcagaacaaa aactcatctc agaagaggat      360
ctgaatgggg ccgcatagac tgtgaaa                                           387

```

<210> 14

<211> 60

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: нуклеотидная последовательность линкерной последовательности анти-ED-A-антитела H1

<400> 14

```

ggcgggtggag gttctggcgg cgggtggcagt ggcgggtggag gttccggggg tggaggatct      60

```

<210> 15

<211> 17

<212> Белок

<213> Mus musculus

<400> 15

```

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

```

Arg

<210> 16

<211> 12

<212> Белок

<213> Mus musculus

<400> 16

```

Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg
1           5           10

```

<210> 17

<211> 52  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: частично вырожденный праймер

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 27, 28, 30, 31, 33, 34  
 <223> n i s a o r g o r c o r t

<400> 17  
 ctggagcctg gcggaccsag ctcatmnmn nmngctaaa ggtgaatcca ga 52

<210> 18  
 <211> 58  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: частично вырожденный праймер

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 28, 29, 31, 32, 34, 35  
 <223> n i s a o r g o r c o r t

<400> 18  
 ccaggtttct gctggtacca ggctaamnm nmngctaa cactctgact ggcctgc 58

<210> 19  
 <211> 26  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: праймер LMB3long

<400> 19  
 saggaacag ctatgaccat gattac 26

<210> 20  
 <211> 30  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: праймер fdseqlong

<400> 20  
 gacgttagta aatgaatctt ctgtatgagg 30

<210> 21  
 <211> 118  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: аминокислотная

## последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела B2

&lt;400&gt; 21

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 Thr Phe Ser Ala Ala  
 20 25 30

Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 125

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
 последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела B2

&lt;400&gt; 22

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Val Ala  
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65

70

75

80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
                                   85                                  90                                  95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
                                   115                                  120                                  125

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
 последовательность CDR1 тяжелой цепи анти-ED-A-антитела B2

&lt;400&gt; 23

Ala Ala Lys

1

&lt;210&gt; 24

&lt;400&gt; 24

000

&lt;210&gt; 25

&lt;400&gt; 25

000

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
 последовательность CDR1 легкой цепи анти-ED-A-антитела B2

&lt;400&gt; 26

Val Ala Phe

1

&lt;210&gt; 27

&lt;400&gt; 27

000

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Искусственная последовательность: линкерная последовательность димерного антитела F8

&lt;400&gt; 28

Gly Ser Ser Gly Gly  
1 5

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Искусственная последовательность: линкерная последовательность димерного антитела F8

&lt;400&gt; 29

gggtccagtg gcggt

15

&lt;210&gt; 30

&lt;400&gt; 30

000

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Искусственная последовательность: аминокислотная последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела G9

&lt;400&gt; 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Met  
20 25 30Gln Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 32  
 <211> 125  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
 последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела G9

<400> 32

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ala  
 20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
 85 90 95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
 115 120 125

<210> 33  
 <211> 3  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
 последовательность CDR1 тяжелой цепи анти-ED-A-антитела G9

<400> 33

His Met Gln  
 1

<210> 34

<400> 34  
000

<210> 35

<400> 35  
000

<210> 36

<211> 3

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность CDR1 легкой цепи анти-ED-A-антитела G9

<400> 36

Thr Ala Phe

1

<210> 37

<400> 37  
000

<210> 38

<400> 38  
000

<210> 39

<400> 39  
000

<210> 40

<400> 40  
000

<210> 41

<211> 118

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела C5

<400> 41

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 Thr Phe Ser Pro Ile  
20                   25                   30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 42

<211> 125

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
 последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела C5

<400> 42

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu His  
 20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
 85 90 95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
115 120 125

<210> 43

<211> 3

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность CDR1 тяжелой цепи анти-ED-A-антитела C5

<400> 43

Pro Ile Thr

1

<210> 44

<400> 44

000

<210> 45

<400> 45

000

<210> 46

<211> 3

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность CDR1 легкой цепи анти-ED-A-антитела C5

<400> 46

Leu His Phe

1

<210> 47

<400> 47

000

<210> 48

<400> 48

000

<210> 49

<400> 49

000

<210> 50

<400> 50

000

<210> 51  
 <211> 118  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
 последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела D5

<400> 51

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 Thr Phe Ser Val Met  
 20 25 30

Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 52  
 <211> 125  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
 последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела D5

<400> 52

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ala  
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35

40

45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
 85 90 95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
 115 120 125

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Искусственная последовательность: аминокислотная последовательность CDR1 тяжелой цепи анти-ED-A-антитела D5

&lt;400&gt; 53

Val Met Lys

1

&lt;210&gt; 54

<400> 54  
000

&lt;210&gt; 55

<400> 55  
000

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Искусственная последовательность: аминокислотная последовательность CDR1 легкой цепи анти-ED-A-антитела D5

&lt;400&gt; 56

Asn Ala Phe

1

&lt;210&gt; 57

<400> 57  
000

<210> 58

<400> 58  
000

<210> 59

<400> 59  
000

<210> 60

<400> 60  
000

<210> 61

<211> 118

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела E5

<400> 61

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 Thr Phe Ser Thr Gly  
20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 62

<211> 125



<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела E5

<400> 62

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Ala  
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
85 90 95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
115 120 125

<210> 63

<211> 3

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная последовательность CDR1 тяжелой цепи анти-ED-A-антитела E5

<400> 63

Thr Gly Ser  
1

<210> 64

<400> 64  
000

<210> 65

<400> 65

000

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Искусственная последовательность: аминокислотная последовательность CDR1 легкой цепи анти-ED-A-антитела E5

&lt;400&gt; 66

Leu Ala His

1

&lt;210&gt; 67

&lt;400&gt; 67

000

&lt;210&gt; 68

&lt;400&gt; 68

000

&lt;210&gt; 69

&lt;400&gt; 69

000

&lt;210&gt; 70

&lt;400&gt; 70

000

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Искусственная последовательность: аминокислотная последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела C8

&lt;400&gt; 71

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	Thr	Phe	Ser	Leu	Gln
		20						25					30		

Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			

Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 72

<211> 125

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела C8

<400> 72

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
85 90 95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
115 120 125

<210> 73

<211> 3

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность CDR1 тяжелой цепи анти-ED-A-антитела C8

<400> 73

Leu Gln Thr

1

<210> 74

<400> 74  
000

<210> 75

<400> 75  
000

<210> 76

<211> 3

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность CDR1 легкой цепи анти-ED-A-антитела C8

<400> 76

Leu Pro Phe

1

<210> 77

<400> 77  
000

<210> 78

<400> 78  
000

<210> 79

<400> 79  
000

<210> 80

<400> 80  
000

<210> 81

<211> 118

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела F8

&lt;400&gt; 81

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 Thr Phe Ser Leu Phe  
 20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 82

&lt;211&gt; 125

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
 последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела F8

&lt;400&gt; 82

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Met Pro  
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65

70

75

80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
85 90 95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
115 120 125

<210> 83

<211> 3

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность CDR1 тяжелой цепи анти-ED-A-антитела F8

<400> 83

Leu Phe Thr

1

<210> 84

<400> 84

000

<210> 85

<400> 85

000

<210> 86

<211> 3

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность CDR1 легкой цепи анти-ED-A-антитела F8

<400> 86

Met Pro Phe

1

<210> 87

<400> 87

000

<210> 88

<400> 88

000

<210> 89

<400> 89  
000

<210> 90

<400> 90  
000

<210> 91

<211> 118

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела F1

<400> 91

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 Thr Phe Ser Gln Ala  
                      20                         25                         30

Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
          35                         40                         45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
          50                         55                         60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65                         70                         75                         80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                      100                         105                         110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
          115

<210> 92

<211> 125

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела F1

<400> 92

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
 85 90 95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
 115 120 125

<210> 93

<211> 3

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
 последовательность CDR1 тяжелой цепи анти-ED-A-антитела F1

<400> 93

Gln Ala Arg

1

<210> 94

<400> 94

000

<210> 95

<400> 95

000

<210> 96

<211> 3

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>



<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность CDR1 легкой цепи анти-ED-A-антитела F1

<400> 96

Ala Pro Phe  
1

<210> 97

<400> 97  
000

<210> 98

<400> 98  
000

<210> 99

<400> 99  
000

<210> 100

<400> 100  
000

<210> 101

<211> 118

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела B7

<400> 101

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 Thr Phe Ser His Phe  
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 102

<211> 125

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
 последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела B7

<400> 102

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Ala  
 20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
 85 90 95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
 115 120 125

<210> 103

<211> 3

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
 последовательность CDR1 тяжелой цепи анти-ED-A-антитела B7

<400> 103

His Phe Asp

1

<210> 104

<400> 104  
000

<210> 105

<400> 105  
000

<210> 106

<211> 3

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность CDR1 легкой цепи анти-ED-A- антитела B7

<400> 106

Leu Ala Phe

1

<210> 107

<400> 107  
000

<210> 108

<400> 108  
000

<210> 109

<400> 109  
000

<210> 110

<400> 110  
000

<210> 111

<211> 118

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность VH-домена анти-ED-A-антитела E8

<400> 111

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 Thr Phe Ser Asp Met

28

20

25

30

His Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 112

<211> 125

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
последовательность VL-домена анти-ED-A-антитела E8

<400> 112

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
85 90 95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
 115 .120 125

<210> 113  
 <211> 3  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
 последовательность CDR1 тяжелой цепи анти-ED-A-антитела E8

<400> 113

Asp Met His  
 1

<210> 114

<400> 114  
 000

<210> 115

<400> 115  
 000

<210> 116  
 <211> 3  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: аминокислотная  
 последовательность CDR1 легкой цепи анти-ED-A-антитела E8

<400> 116

Ser Ser Phe  
 1

<210> 117  
 <211> 350  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 117

Asn Gly Leu Gly Pro Ser Lys Thr Lys Thr Ala Ser Pro Asp Gln Thr  
 1 5 10 15

Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gln Pro Thr Val Glu Tyr Val Val Ser  
 20 25 30

Val Tyr Ala Gln Asn Arg Asn Gly Glu Ser Gln Pro Leu Val Gln Thr  
 35 40 45

Ala Val Thr Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val  
50 55 60

Asp Val Asp Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val  
65 70 75 80

Ser Arg Tyr Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg Glu  
85 90 95

Leu Phe Pro Ala Pro Asp Gly Glu Asp Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly  
100 105 110

Leu Arg Pro Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp  
115 120 125

Asp Met Glu Ser Gln Pro Leu Ile Gly Ile Gln Ser Thr Ala Ile Pro  
130 135 140

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

Ala Gln Trp Ile Ala Pro Ser Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg  
165 170 175

Val Asn Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ser  
180 185 190

Pro Asp Ser Ser Ser Val Ile Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys  
195 200 205

Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro  
210 215 220

Ala Gln Gly Val Ile Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg  
225 230 235 240

Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg  
245 250 255

Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Ile Pro Ala  
260 265 270

Asn Gly Gln Thr Pro Val Gln Arg Ser Ile Ser Pro Asp Val Arg Ser  
275 280 285

Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile His Leu  
290 295 300

Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Ile Ile Asp Ala  
 305 310 315 320

Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Thr Thr Thr  
 325 330 335

Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Ala Pro Arg Ala Arg  
 340 345 350

<210> 118

<211> 90

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 118

Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp  
 1 5 10 15

Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr  
 20 25 30

Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile His Glu Leu Phe Pro  
 35 40 45

Ala Pro Asp Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro  
 50 55 60

Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met Glu  
 65 70 75 80

Ser Gln Pro Leu Ile Gly Thr Gln Ser Thr  
 85 90

<210> 119

<211> 90

<212> Белок

<213> Mus musculus

<400> 119

Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp  
 1 5 10 15

Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr  
 20 25 30

Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg Glu Leu Phe Pro  
 35 40 45

Ala Pro Asp Gly Glu Asp Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro

50                                      55                                      60

Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met Glu  
65                                      70                                      75                                      80

Ser Gln Pro Leu Ile Gly Ile Gln Ser Thr  
    85                                      90

<210> 120  
<211> 288  
<212> Бeлoк  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Искусственная последовательность: антиген (11A12),  
          содержащий ED-A-домен человеческого фибронектина

<400> 120

Met Arg Ser Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Met Gln Val  
1                                      5                                      10                                      15

Thr Asp Val Gln Asp Asn Ser Ile Ser Val Lys Trp Leu Pro Ser Ser  
    20                                      25                                      30

Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg Val Thr Thr Thr Pro Lys Asn Gly Pro  
    35                                      40                                      45

Gly Pro Thr Lys Thr Lys Thr Ala Gly Pro Asp Gln Thr Glu Met Thr  
    50                                      55                                      60

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

Gln Asn Pro Ser Gly Glu Ser Gln Pro Leu Val Gln Thr Ala Val Thr  
    85                                      90                                      95

Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp  
    100                                      105                                      110

Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr  
    115                                      120                                      125

Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile His Glu Leu Phe Pro  
    130                                      135                                      140

Ala Pro Asp Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro  
145                                      150                                      155                                      160

Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met Glu  
    165                                      170                                      175



Ser Gln Pro Leu Ile Gly Thr Gln Ser Thr Ala Ile Pro Ala Pro Thr  
 180 185 190

Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp  
 195 200 205

Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro  
 210 215 220

Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser  
 225 230 235 240

Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val  
 245 250 255

Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly  
 260 265 270

Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Arg Ser His His His His His His  
 275 280 285

<210> 121  
 <211> 867  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: нуклеотидная  
 последовательность антигена (11A12)

<400> 121  
 atgagatcct accgaacaga aattgacaaa ccatcccaga tgcaagtgac cgatgttcag 60  
 gacaacagca ttagtgtcaa gtggctgcct tcaagttccc ctgttactgg ttacagagta 120  
 accaccactc ccaaaaatgg accaggacca acaaaaacta aaactgcagg tccagatcaa 180  
 acagaaatga ctattgaagg cttgcagccc acagtggagt atgtggttag tgtctatgct 240  
 cagaatccaa gcggagagag tcagcctctg gttcagactg cagtaaccaa cattgatcgc 300  
 cctaaaggac tggcattcac tgatgtggat gtcgattcca tcaaaattgc ttgggaaagc 360  
 ccacaggggc aagtttccag gtacaggggtg acctactcga gccctgagga tggaatccat 420  
 gagctattcc ctgcacctga tggatgaaga gacactgcag agctgcaagg cctcagaccg 480  
 ggttctgagt acacagtcag tgtggttgcc ttgcacgatg atatggagag ccagcccctg 540  
 attggaacc agtccacagc tattcctgca ccaactgacc tgaagttcac tcaggtcaca 600  
 cccacaagcc tgagcgcca gtggacacca ccaatgttc agctcactgg atatcgagtg 660  
 cgggtgaccc ccaaggagaa gaccggacca atgaaagaaa tcaaccttgc tcctgacagc 720

tcatccgtgg ttgtatcagg acttatgggtg gccaccaa atgaagtgag tgtctatgct 780  
 ctttaaggaca ctttgacaag cagaccagct cagggagttg tcaccactct ggagaatgct 840  
 agatctcatc accatcacca tcaactaa 867

<210> 122  
 <211> 10  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 122

His Tyr Gln Ile Asn Gln Gln Trp Glu Arg  
 1 5 10

<210> 123  
 <211> 9  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 123

Val Gly Asp Thr Tyr Glu Arg Pro Lys  
 1 5

<210> 124  
 <211> 17  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 124

His Ala Leu Gln Ser Ala Ser Ala Gly Ser Gly Ser Phe Thr Asp Val  
 1 5 10 15

Arg

<210> 125  
 <211> 7  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 125

Ile Gly Asp Gln Trp Asp Lys  
 1 5

<210> 126  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 126

Thr Phe Tyr Gln Ile Gly Asp Ser Trp Glu Lys  
 1 5 10

<210> 127  
 <211> 16  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 127

Trp Lys Glu Ala Thr Ile Pro Gly His Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Lys  
 1                   5                           10                           15

<210> 128  
 <211> 14  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 128

Glu Ala Thr Ile Pro Gly His Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Lys  
 1                   5                           10

<210> 129  
 <211> 21  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 129

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

Gln Tyr Gly His Arg  
                   20

<210> 130  
 <211> 12  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 130

Trp Ser Arg Pro Gln Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Arg  
 1                   5                           10

<210> 131  
 <211> 19  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 131

Ser Asp Asn Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Gln Phe Val Glu Leu Thr  
 1                   5                           10                           15

Asp Val Lys

<210> 132  
 <211> 16  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 132

Val Thr Ile Met Trp Thr Pro Pro Asp Ser Val Val Ser Gly Tyr Arg  
 1 5 10 15

<210> 133  
 <211> 15  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 133

Val Glu Val Leu Pro Val Ser Leu Pro Gly Glu His Gly Gln Arg  
 1 5 10 15

<210> 134  
 <211> 18  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 134

Asn Thr Phe Ala Glu Ile Thr Gly Leu Ser Pro Gly Val Thr Tyr Leu  
 1 5 10 15

Phe Lys

<210> 135  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 135

Val Phe Ala Val His Gln Gly Arg  
 1 5

<210> 136  
 <211> 10  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 136

Thr Val Leu Val Thr Trp Thr Pro Pro Arg  
 1 5 10

<210> 137  
 <211> 10  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 137

Gln Tyr Asn Val Gly Pro Leu Ala Ser Lys  
 1 5 10

&lt;210&gt; 138

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 138

Asn Leu Gln Pro Gly Ser Glu Tyr Thr Val Thr Leu Val Ala Val Lys  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 139

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 139

Ala Thr Gly Val Phe Thr Thr Leu Gln Pro Leu Arg  
 1 5 10

&lt;210&gt; 140

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 140

Leu Gly Val Arg Pro Ser Gln Gly Gly Glu Ala Pro Arg  
 1 5 10

&lt;210&gt; 141

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 141

Val Val Thr Pro Leu Ser Pro Pro Thr Asn Leu His Leu Glu Ala Asn  
 1 5 10 15

Pro Asp Thr Gly Val Leu Thr Val Ser Trp Glu Arg  
 20 25

&lt;210&gt; 142

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 142

Ser Thr Thr Pro Asp Ile Thr Gly Tyr Arg  
 1 5 10

<210> 143  
 <211> 17  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 143

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Glu Leu Thr Asn Leu Leu Val  
 1 5 10 15

Arg

<210> 144  
 <211> 27  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 144

Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Phe Asp Ser Ser Asp Ile Thr Ala  
 1 5 10 15

Asn Ser Phe Thr Val His Trp Val Ala Pro Arg  
 20 25

<210> 145  
 <211> 9  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 145

Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Arg  
 1 5

<210> 146  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 146

His His Ala Glu His Ser Val Gly Arg Pro Arg  
 1 5 10

<210> 147  
 <211> 18  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 147

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

Pro Arg

<210> 148  
 <211> 21  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 148

Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr  
 1 5 10 15

Val Pro Gly Ser Lys  
 20

<210> 149  
 <211> 12  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 149

Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys  
 1 5 10

<210> 150  
 <211> 24  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 150

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

Thr Leu Tyr Ala Val Thr Gly Arg  
 20

<210> 151  
 <211> 15  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 151

Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Val Ser Ile Asn Tyr Lys  
 1 5 10 15

<210> 152  
 <211> 22  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 152

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

Asn Ser Ile Ser Val Arg  
 20

<210> 153  
 <211> 12  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 153

Trp Leu Pro Ser Thr Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg  
 1 5 10

<210> 154  
 <211> 29  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 154

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

Thr Val Glu Tyr Val Val Ser Val Tyr Ala Gln Asn Arg  
 20 25

<210> 155  
 <211> 22  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 155

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

Ala Pro Thr Asn Leu Lys  
 20

<210> 156  
 <211> 19  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 156

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

Arg Pro Lys



<210> 157  
 <211> 12  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 157

Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg  
 1 5 10

<210> 158  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 158

Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg  
 1 5 10

<210> 159  
 <211> 24  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 159

Phe Ser Gln Val Thr Pro Thr Ser Phe Thr Ala Gln Trp Ile Ala Pro  
 1 5 10 15

Ser Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg  
 20

<210> 160  
 <211> 9  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 160

Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys  
 1 5

<210> 161  
 <211> 24  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 161

Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Ile Pro Ala  
 1 5 10 15

Asn Gly Gln Thr Pro Val Gln Arg  
 20

<210> 162

<211> 22  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 162

Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Ile Pro Ala Asn Gly  
 1 5 10 15

Gln Thr Pro Val Gln Arg  
 20

<210> 163  
 <211> 14  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 163

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

<210> 164  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 164

Ile His Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg  
 1 5 10

<210> 165  
 <211> 19  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 165

Ser Ser Pro Val Ile Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser  
 1 5 10 15

Asn Leu Arg

<210> 166  
 <211> 17  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 166

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

Arg

<210> 167  
 <211> 7  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 167

Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys  
 1 5

<210> 168  
 <211> 9  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 168

Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg  
 1 5

<210> 169  
 <211> 17  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 169

Pro Tyr Leu Pro Asn Val Asp Glu Glu Val Gln Ile Gly His Val Pro  
 1 5 10 15

Arg

<210> 170  
 <211> 15  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 170

Gly Val Thr Tyr Asn Ile Ile Val Glu Ala Leu Gln Asn Gln Arg  
 1 5 10 15

<210> 171  
 <211> 23  
 <212> Белок  
 <213> Mus musculus

<400> 171

Arg Pro Gly Ala Ala Glu Pro Ser Pro Asp Gly Thr Thr Gly His Thr  
 1 5 10 15

Tyr Asn Gln Tyr Thr Gln Arg  
 20

<210> 172  
 <211> 118  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: VH-домен  
 анти-ED-A-антитела H1

<400> 172

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

Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 173  
 <211> 118  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: VH-домен  
 анти-ED-A-антитела B2

<400> 173

Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Phe Ser Ala Ala  
 20 25 30

Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 174

<211> 118

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: VH-домен  
анти-ED-A-антитела C5

<400> 174

Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Phe Ser Pro Ile  
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 175  
 <211> 118  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: VH-домен  
 анти-ED-A-антитела D5

<400> 175

Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Phe Ser Val Met  
 20 25 30

Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 176  
 <211> 118  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: VH-домен  
 анти-ED-A-антитела E5

<400> 176

Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Phe Ser Thr Gly  
 20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 177  
 <211> 118  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: VH-домен  
 анти-ED-A-антитела C8

<400> 177

Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Phe Ser Leu Gln  
 20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 178  
 <211> 118  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Искусственная последовательность: VH-домен  
 анти-ED-A-антитела F8  
  
 <400> 178

```

Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Phe Ser Leu Phe
          20          25          30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110
Leu Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 179  
 <211> 118  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Искусственная последовательность: VH-домен  
 анти-ED-A-антитела F1  
  
 <400> 179

```

Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Phe Ser Gln Ala
          20          25          30

```



Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 180

<211> 118

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: VH-домен  
 анти-ED-A-антитела B7

<400> 180

Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Phe Ser His Phe  
 20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 181  
<211> 118  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Искусственная последовательность: VH-домен  
анти-ED-A-антитела E8

<400> 181

Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Phe Ser Asp Met  
20 25 30

His Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 182  
<211> 118  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Искусственная последовательность: VH-домен  
анти-ED-A-антитела G9

<400> 182

Glu Val Gln Leu Leu 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 Thr Phe Ser His Met  
20 25 30

Gln Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 183

<211> 125

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: VL-домен  
 анти-ED-A-антитела H1

<400> 183

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
 85 90 95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
 115 120 125

<210> 184  
 <211> 125  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: VL-домен  
 анти-ED-A-антитела B2

<400> 184

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
 85 90 95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
 115 120 125

<210> 185  
 <211> 125  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: VL-домен  
 анти-ED-A-антитела C5

<400> 185

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu His

20

25

30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
 85 90 95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
 115 120 125

<210> 186

<211> 125

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: VL-домен  
 анти-ED-A-антитела D5

<400> 186

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ala  
 20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
 85 90 95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
 115 120 125

<210> 187  
 <211> 125  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: VL-домен  
 анти-ED-A-антитела E5

<400> 187

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
 85 90 95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
 115 120 125

<210> 188  
 <211> 125  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: VL-домен  
 анти-ED-A-антитела C8

<400> 188

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
                   85                                  90                                  95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
           115                                  120                                  125

<210> 189  
 <211> 125  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Искусственная последовательность: VL-домен  
       анти-ED-A-антитела F8

<400> 189

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
                   85                                  90                                  95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu

100

105

110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
 115 120 125

&lt;210&gt; 190

&lt;211&gt; 125

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> Искусственная последовательность: VL-домен  
анти-ED-A-антитела F1

&lt;400&gt; 190

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
 85 90 95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
 115 120 125

&lt;210&gt; 191

&lt;211&gt; 125

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> Искусственная последовательность: VL-домен  
анти-ED-A-антитела B7

&lt;400&gt; 191

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



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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
 85 90 95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
 115 120 125

<210> 192

<211> 125

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: VL-домен  
 анти-ED-A-антитела E8

<400> 192

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
 85 90 95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
 115 120 125

<210> 193

<211> 125

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственная последовательность: VL-домен  
 анти-ED-A-антитела G9

<400> 193

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro  
 85 90 95

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
 115 120 125

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которое связывается с изоформой экстра-домена А (ED-A) фибронектина, где указанное антитело содержит:

(i) домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, где аминокислота в положении 5 последовательности SEQ ID NO:81 является остатком лейцина (L), а не остатком валина (V); и

(ii) домен VL, содержащий аминокислоты 1-108 последовательности SEQ ID NO:82, где аминокислота в положении 18 последовательности SEQ ID NO:82 является остатком аргинина (R), а не остатком лизина (K).

2. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1, где антитело содержит единичную цепь Fv (scFv) или является диателом.

3. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.1 или 2, где указанный домен VH конъюгирован с указанным доменом VL через пептидный линкер.

4. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.3, где указанный пептидный линкер содержит 5-25 аминокислот.

5. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.4, где указанный пептидный линкер содержит 5 аминокислот.

6. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент конъюгирован с детектируемой меткой или радиоизотопом.

7. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент конъюгирован с молекулой, которая имеет биоцидную или цитотоксическую активность, или с радиоизотопом.

8. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.7, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент конъюгирован с биоцидной или цитотоксической молекулой через пептидный линкер.

9. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.7 или 8, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент находится в форме слитого белка, содержащего биоцидную или

цитотоксическую молекулу и антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

10. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где указанное антитело или его антиген-связывающий фрагмент конъюгирован с цитокином.

11. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.10, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент конъюгирован с указанным цитокином через пептидный линкер.

12. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.10 или 11, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент находится в форме слитого белка, содержащего цитокин и антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

13. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент конъюгирован с токсином, нацеливающей молекулой или ферментом.

14. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п.13, где токсин, нацеливающая молекула или фермент конъюгирован с антителом или его антиген-связывающим фрагментом через пептидный линкер.

15. Конъюгат антитела, содержащий:

(i) антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который связывается с ED-A фибронектина, содержащим домен VH и домен VL,

(a) где указанный домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, где аминокислота в положении 5 последовательности SEQ ID NO:81 является остатком лейцина (L), а не остатком валина (V); и

(b) где указанный домен VL содержит аминокислоты 1-108 последовательности SEQ ID NO:82, где аминокислота в положении 18 последовательности SEQ ID NO:82 является остатком аргинина (R), а не остатком лизина (K),

где указанный домен VH конъюгирован с указанным доменом VL через 5-и аминокислотный пептидный линкер; и

(ii) цитокин.

16. Конъюгат антитела по п.15, где антитело представляет

собой диатело.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп.1-14, или конъюгат антитела по п.15 или 16, в фармацевтически приемлемом носителе.

18. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп.1-5 и 10-12, или конъюгат антитела по п.16 или 17.

19. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.18.

20. Способ получения антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп.1-5 и 10-12, или конъюгата антитела по п.16 или 17, включающий культивирование клетки-хозяина по п.19 в условиях для получения указанного антитела или его антиген-связывающего фрагмента, или указанного конъюгата антитела.

21. Способ по п.20, дополнительно включающий выделение указанного антитела или его антиген-связывающего фрагмента, или указанного конъюгата антитела.

22. Применение антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп.1-5 для получения лекарственного средства для лечения метастазов опухолей, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент конъюгирован с молекулой, которая обладает биоцидной или цитотоксической активностью.

23. Применение антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп.1-5 для получения лекарственного средства для доставки к сосудистому руслу метастазов опухоли молекулы, конъюгированной с антителом, где молекула обладает биоцидной или цитотоксической активностью.

24. Применение антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп.1-6 для получения диагностического продукта для диагностики метастазов опухолей.

25. Способ обнаружения или диагностики метастазов опухолей у человека или животного, включающий стадии:

(а) введения человеку или животному антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп.1-6, и

(b) определение наличия или отсутствия антитела или его

антиген-связывающего фрагмента в месте, находящемся на расстоянии от места, в котором в настоящее время или ранее находилась первичная опухоль, в организме человека или животного;

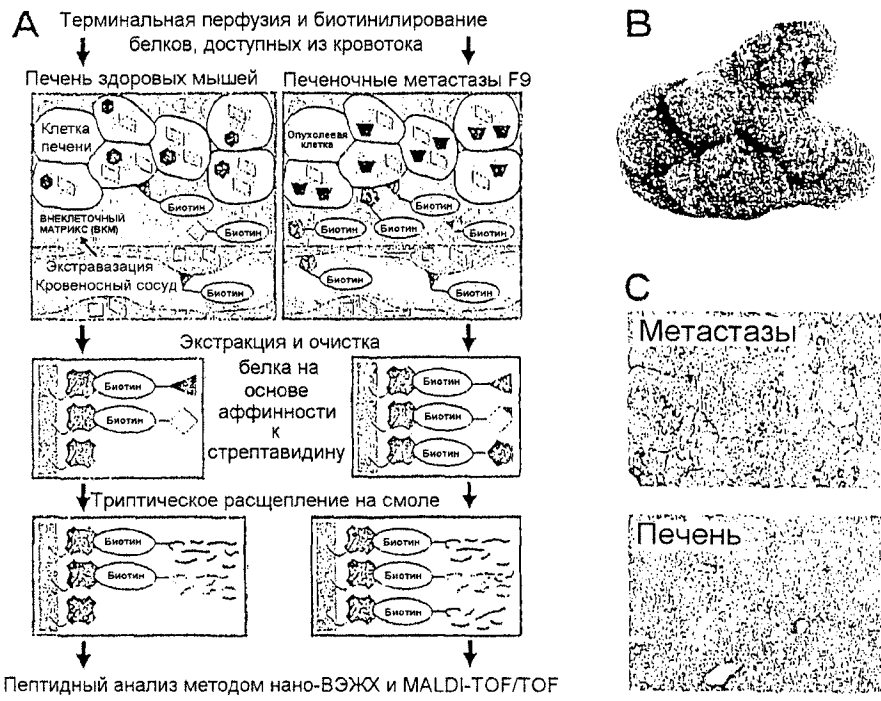
где расположение антитела или его антиген-связывающего фрагмента на месте, находящемся на расстоянии от места, в котором в настоящее время или ранее находилась первичная опухоль, в организме человека или животного указывает на наличие метастазов опухоли.

26. Способ лечения метастазов опухолей у индивида, включающий введение индивиду терапевтически эффективного количества лекарственного средства, содержащего антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп.1-5, 7-9 или 13-14, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент конъюгирован с молекулой, обладающей биоцидной или цитотоксической активностью.

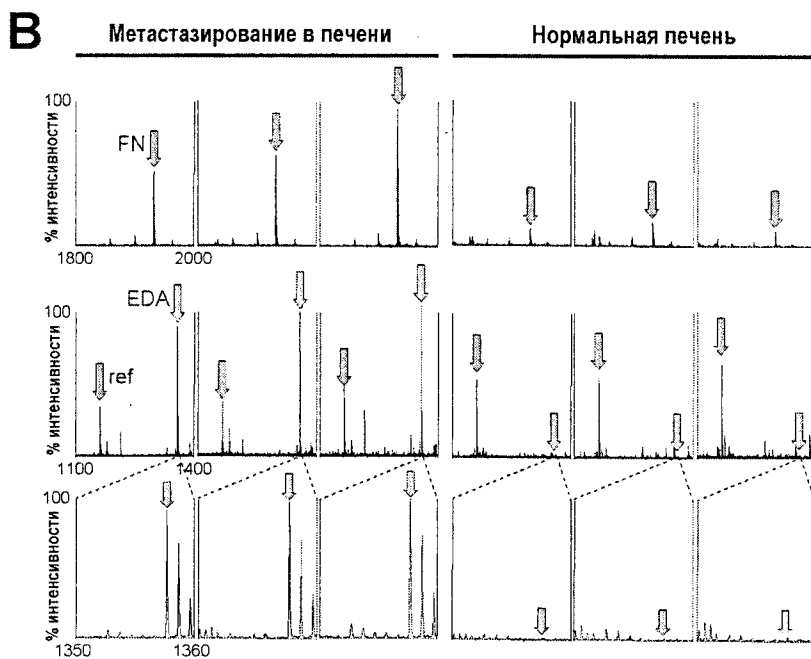
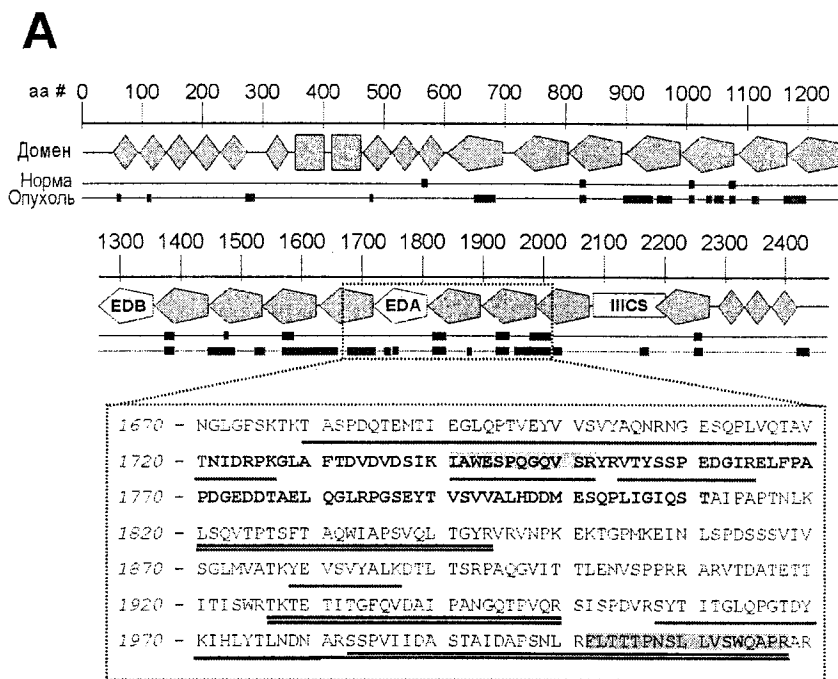
27. Способ доставки молекулы к сосудистому руслу метастазов опухоли у человека или животного, включающий введение человеку или животному антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп.1-5, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент конъюгирован с молекулой, обладающей биоцидной или цитотоксической активностью.

По доверенности

Фиг. 1

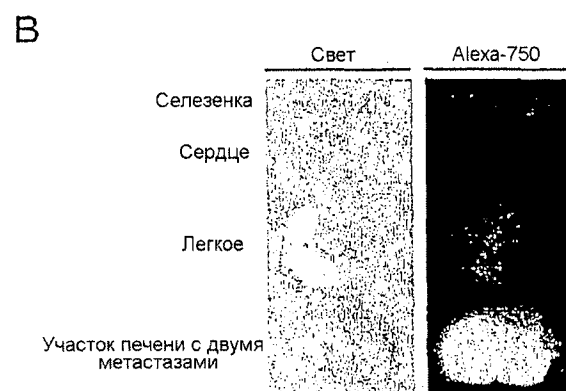
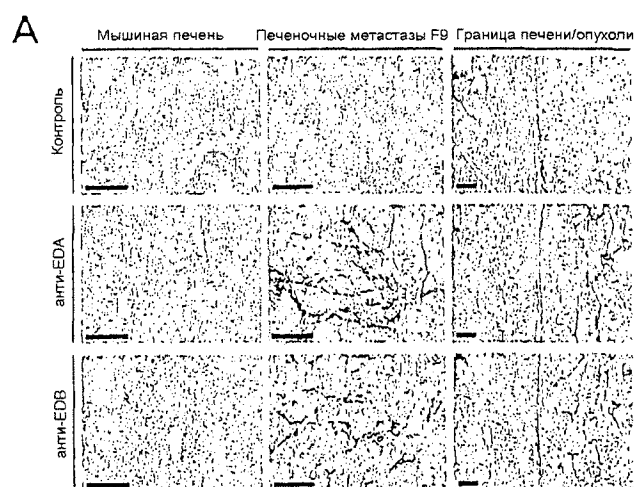


Фиг.2

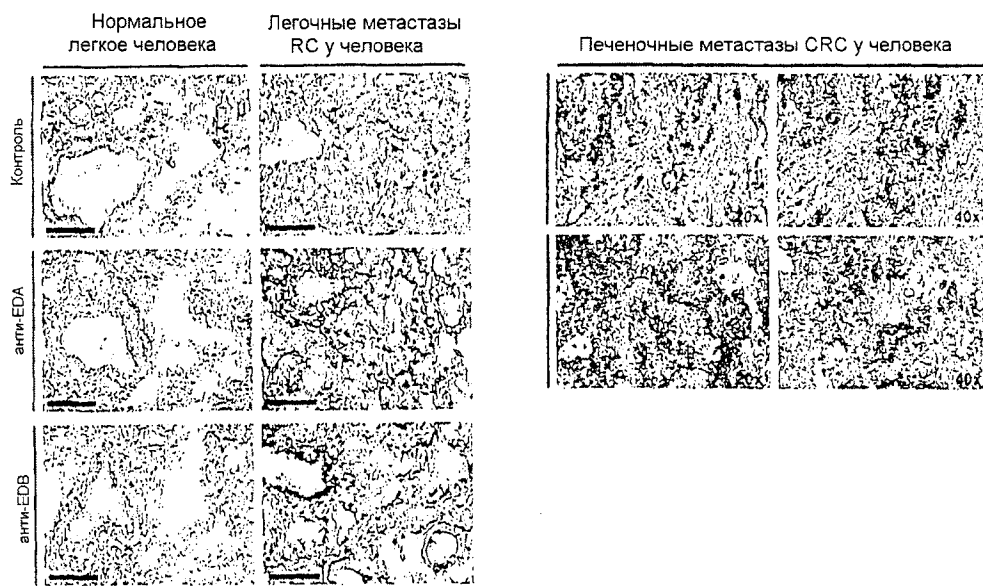




Фиг. 3



Фиг. 4



человек 1 NIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWESPQGQVSRVRYVTYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELO  
\*\*\*\*\*  
мышь 1 NIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWESPQGQVSRVRYVTYSSPEDGIRELFPAPDGEDDTAELO

человек 61 GLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGTQST  
\*\*\*\*\*  
мышь 61 GLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGIQST

Фиг. 5

A

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG  
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTT  
TAGCCCGCGGAGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG  
GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA  
CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG  
AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG  
AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTC  
ATTTGTATCTTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC  
CGTCTCGAGT

B

GGCGGTGGAGGTTCTGGCGGCCGGTGGCAGTGGCGGTGGAGGTT  
CCGGGGGTGGAGGATCT

Фиг. 6

C

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTC  
CAGGGGAAAAAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT  
TAGCTCTGCGTGGTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAG  
GCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTG  
GCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT  
CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTG  
TATTACTGTCAGCAGATATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTCCGGCC  
AAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGCGGCCGCAGAACAAAAACT  
CATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCATAGACTGTGAAA

Фиг. 6 продолжение

A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPRRMSWVRQ  
APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNT  
LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVS  
S

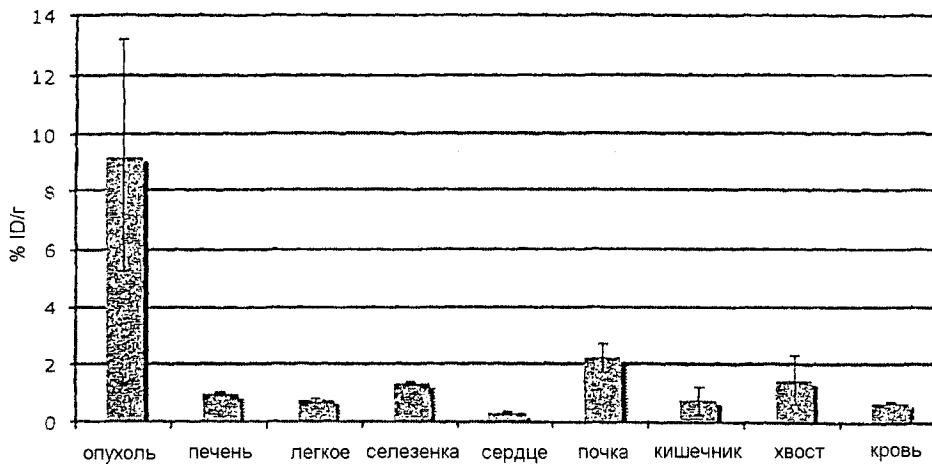
B

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

C

EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGEKATLSCRASQSVSSAWLAWYQQ  
KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR  
LEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKAAAEQKLIS  
EEDLNGAA

Фиг. 7



Фиг. 8

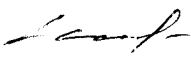
## ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

## ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42  
Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201301224

Дата подачи: 31 марта 2008 (31.03.2008)		Дата испрашиваемого приоритета: 02 апреля 2007 (02.04.2007)	
Название изобретения: Новый антиген, ассоциированный с новообразованными сосудами опухолевых метастазов			
Заявитель: ФИЛОДЖЕН С.П.А.			
<input type="checkbox"/> Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа)			
<input type="checkbox"/> Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)			
А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:			
	<i>C07K 16/18</i>	(2006.01)	
	<i>C07K 19/00</i>	(2006.01)	
	<i>C12N 15/13</i>	(2006.01)	
	<i>C12N 5/10</i>	(2006.01)	
	<i>A61K 39/395</i>	(2006.01)	
	<i>A61P 35/00</i>	(2006.01)	
Согласно международной патентной классификации (МПК)		<i>G01N 33/53</i>	(2006.01)
Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:			
Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК) C07K 16/18, 19/00, C12N 15/13, 5/10, A61K 39/395, A61P 35/00, G01N 33/53			
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:			
В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ			
Категория	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей		Относится к пункту №
A	US 5571679 A (OTSUKA PHARMACEUTICAL FACTORY, INC.) 05.11.1996, реферат, колонки 2, 7-8, пп. 1, 4 формулы		1-16, 18-21, 25
A	BORSI, Laura et al. Preparation of Phage Antibodies to the ED-A Domain of Human Fibronectin. Experimental Cell Research, 1998, 240, pp. 244-251, особенно с. 245-247		1-16, 18-21
A	SCARPINO, Stefania et al. Expression of EDA/EDB isoforms of fibronectin in papillary carcinoma of the thyroid. J. Pathol., 1999, 188, pp. 163-167, реферат, с. 166		1-27
<input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы В <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении			
* Особые категории ссылочных документов:			
"А"	документ, определяющий общий уровень техники		"Г" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
"Е"	более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее		"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
"О"	документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.		"У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
"Р"	документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета		"&" документ, являющийся патентом-аналогом
"D"	документ, приведенный в евразийской заявке		"L" документ, приведенный в других целях
Дата действительного завершения патентного поиска: 31 марта 2014 (31.03.2014)			
Наименование и адрес Международного поискового органа: <b>Федеральный институт промышленной собственности</b> РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб., 30-1. Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА		Уполномоченное лицо:  О. Николаева Телефон № (499) 240-25-91	