



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **114707** (13) **C2**
(51) МПК (2017.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/26 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61P 5/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21)	Номер заявки:	а 2013 12685	(56)	Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2010040508 A1, 15.04.2010 WO 2007068895 A1, 21.06.2007 US 2008242587 A1, 02.10.2008 JEFFREY L BROWN et al. A Human Monoclonal Anti-ANG2 Antibody Leads to Broad Antitumor Activity in Combination with VEGF Inhibitors and Chemotherapy Agents in Preclinical Models MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, AMERICAN ASSOCIATION OF CANCER RESEARCH. - US. - 01.01.2010. - Vol. 9. - № 1. - P. 145 - 156 SCHEUER W et al. "468 Anti-tumoral and anti-metastatic activity of a tetravalent bispecific antibody (TAvi6) targeting VEGF and Angiopoietin-2", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER. SUPPLEMENT, PERGAMON, OXFORD, GB, 01.11.2010. - Vol. 8. - № 7. - P. 150 - 151 H. HASHIZUME ET AL, "Complementary Actions of Inhibitors of Angiopoietin-2 and VEGF on Tumor Angiogenesis and Growth", CANCER RESEARCH, 15.03.2010. - Vol. 70. - № 6, P. 2213 - 2223 V. R. DOPPALAPUDI ET AL, "Chemical generation of bispecific antibodies", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 28.12.2010, Vol. 107. - № 52. - P. 22611 - 22616 W. SCHAEFER ET AL, "Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 05.07.2011. - Vol. 108. - № 27, P. 11187 - 11192 MARVIN J S ET AL, "BISPECIFIC ANTIBODIES FOR DUAL-MODALITY CANCER THERAPY: KILLING TWO SIGNALING CASCADES WITH ONE STONE", CURRENT OPINION IN DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, 01.03.2006. - Vol. 9. - № 2. - P. 184 - 193 HARMSSEN M M ET AL, "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, 18.08.2007. - Vol. 77, № 1, P. 13 - 22 RUDIKOFF S ET AL, "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, WASHINGTON, DC. - US. -, 01.03.1982. - Vol. 79. - P. 1979 - 1983 WO 2007089445 A2, 09.08.2007
(22)	Дата подання заявки:	30.03.2012		
(24)	Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.07.2017		
(31)	Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	11160921.0		
(32)	Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	01.04.2011		
(33)	Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		
(41)	Публікація відомостей про заявку:	25.02.2014, Бюл.№ 4		
(46)	Публікація відомостей про видачу патенту:	25.07.2017, Бюл.№ 14		
(86)	Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2012/055901, 30.03.2012		
(72)	Винахідник(и): Гшвінд Андреас (DE/AT), Отт Рене Георг (AT), Букно Йоахім (BE), Бюіз Марі-Анж (BE), Депла Ерік (BE)			
(73)	Власник(и): БЬОРІНГЕР ІНГЕЛЬХАЙМ ІНТЕРНАЦІОНАЛЬ ГМБХ, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany (DE)			
(74)	Представник: Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139			

(54) БІСПЕЦИФІЧНА ЗВ'ЯЗУВАЛЬНА МОЛЕКУЛА, ЯКА ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З VEGF І Ang2

UA 114707 C2

(57) Реферат:

Винахід стосується біспецифічної зв'язувальної молекули, яка зв'язує VEGF і Ang2, у формі імуноглобулінового одиничного варіабельного домену типу VHH, вектора, клітини-хазяїна, фармацевтичної композиції, що містить зазначене антитіло та способу одержання такого антитіла.

Галузь техніки, до якої належить винахід

Даний винахід належить до галузі терапії людини, зокрема, протиракової терапії, і до агентів і композицій, що застосовуються у такій терапії.

Передумови створення винаходу

5 Коли пухлини досягають критичного розміру, що становить приблизно 1 мм³, вони починають залежати від ангиогенезу для забезпечення надходження з кров'ю кисню і поживних речовин, що дозволяють їм продовжувати зростання. Антиангіогенні терапії стали важливим методом лікування при деяких типах пухлин. Ці терапії сфокусовані на блокаді шляху VEGF (Ferrara та ін, Nat Rev Drug Discov. 3 (5), травень 2004 р., сс. 391-400.) Шляхом нейтралізації VEGF (авастин) або його рецепторів (сутент і сорафеніб). Сучасні дослідження, проведені на мишах, продемонстрували, що ангиопоетин-2 (Ang2), ліганд Tie2-рецептора, контролює ремоделювання судин, забезпечуючи функціонування інших ангиогенних факторів, таких як VEGF. Ang2 експресується краще ендотеліальними клітинами, установлено, що має місце його сильна індукція під дією гіпоксії та інших ангиогенних факторів, і було продемонстровано, що він регулює пластичність судин пухлини, що дозволяє судинам реагувати на VEGF і FGF2 (Augustin та ін, Nat Rev Mol Cell Biol. 10 (3), березень 2009, сс. 165-177). Встановлено, що елімінування або інгібування Ang2 призводить до зниженого ангиогенезу (Falcón та ін, Am J Pathol. 175 (5), листопад 2009, сс. 2159-2170), що узгоджується з вказаною роллю. Підвищені концентрації Ang2 у сироватці виявлені у пацієнтів з колоректальним раком (CRC), NSCLC і меланомою (Goede та ін, Br J Cancer. 103 (9), 26 жовтня 2010 р., сс. 1407-1414); Park та ін, Chest. 132 (1), липень 2007 р., сс. 200-206; Helfrich та ін, Clin Cancer Res. 15 (4), 15 лютого 2009 р., сс. 1384-1392.). При CRC-раку рівні Ang2 у сироватці корелюють з терапевтичною відповіддю на анти-VEGF терапію.

Система Ang-Tie складається з двох рецепторів (Tie1 і Tie2) і трьох лігандів (Ang1, Ang2 і Ang4) (Augustin та ін, Nat Rev Mol Cell Biol. 10 (3), березень 2009, сс. 165-177). Tie2, Ang1 і Ang2 є найбільш детально вивченими представниками цього сімейства, Tie1 являє собою сирітський рецептор, а роль Ang4 у ремоделюванні судин ще підлягає вивченню. Ang2 і Ang1 опосередковують протилежні функції при зв'язуванні з Tie2 та активації. Опосередковувана Ang2 активація Tie2 призводить до активації ендотеліальних клітин, дисоціації перицитів, просочуванню з судин і індукції і розростання судин. На відміну від Ang2 передача сигналів Ang1 підтримує цілісність судин шляхом рекрутменту перицитів, підтримуючи тим самим стан спокою ендотеліальних клітин.

Ангиопоетин 2 (Ang2) являє собою що секретується ліганд для тирозинкіназного Tie2-рецептора з молекулярною масою 66 кДа (Augustin та ін, Nat Rev Mol Cell Biol. 10 (3), березень 2009, сс. 165-177). Ang2 складається з N-кінцевого «coiled-coil» домену та C-кінцевого фібріногенподібного домену, останній необхідний для взаємодії з Tie2. Ang2 експресується головним чином ендотеліальними клітинами, було встановлено, що має місце його сильна індукція під дією гіпоксії та інших ангиогенних факторів, включаючи VEGF. Tie2 виявлений у ендотеліальних клітинах, гематопоетичних стовбурових клітинах і пухлинних клітинах. Встановлено, що взаємодія Ang2-Tie2 регулює пластичність судин пухлини, що дозволяє судинам реагувати на VEGF і FGF2.

In vitro встановлено, що Ang2 діє у якості що має помірну ефективність мітогену, хемоаттрактанта і індуктора утворення трубочок у ендотеліальних клітинах пупкової вени людини (HUVEC). Ang2 індуктує фосфорилування тирозину при ектопічній експресії Tie2 у фібробластах і стимулює передачу сигналів по ходу транскрипції, таких як фосфорилування ERK-MAPK, AKT і FAK, у HUVEC. Описано антагоністичний вплив Ang2 на індуковані Ang1 відповіді ендотеліальних клітин.

Встановлено, що дефіцит Ang2 призводить у мишей до вираженого дефекту лімфатичної структури. Хоча зниження рівня Ang2 не має вирішального значення для розвитку ембріональних судин, миші з дефіцитом Ang2 мали стійкі дефекти судин у сітківці і нирці. Зазначені дані, що розглядаються поєднанні із динамічною схемою експресії Ang2 у місцях ангиогенезу (наприклад, у яєчнику), свідчать про те, що Ang2 контролює ремоделювання судин, забезпечуючи функції інших ангиогенних факторів, таких як VEGF.

Система Ang2-Tie2 має вирішальне значення у процесі ангиогенного «перемикання» і на останніх стадіях ангиогенезу пухлини. Для експресії Ang2 характерна сильна підвищувальна регуляція у асоційованому з пухлиною ендотелії. Уповільнений ріст пухлин виявлений при їх імплантації у мишей з дефіцитом Ang2, насамперед на ранніх стадіях росту пухлини. Встановлено, що терапевтична блокада Ang2 за допомогою МАТ до Ang2 має широкий спектр ефективності у відношенні моделей різних пухлин з використанням ксенотрансплантатів.

Описано додатковий вплив МАТ до Ang2 з використанням інгібіторів VEGFR2 (МАТ і

низькомолекулярні інгібітори).

Як узагальнено у US 2008/0014196, ангиогенез бере участь у патогенезі ряду порушень, включаючи щільні (солідні) пухлини і метастази, а також очні хвороби. Одним з найбільш важливих проангіогенних факторів є судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF), який також

5 позначають як VEGF-A або фактор судинної проникності (VPF). VEGF належить до сімейства генів, що включає плацентарний фактор росту (PLGF), VEGF B, VEGF C, VEGF D, VEGF E і VEGF-F. Альтернативний сплайсинг мРНК одиничного гена людського VEGF призводить до утворення щонайменше шести ізоформ (VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 і VEGF206), при цьому такою, що найбільш часто зустрічається ізоформою є VEGF165.

10 Ідентифіковано два тирозинкіназних рецептора VEGF (VEGFR), які взаємодіють з VEGF, а саме, VEGFR-1 (який також позначають як Flt-1) і VEGFR-2 (який також позначають як KDR або Flk-1). VEGFR-1 має найвищу афінність до VEGF, а VEGFR-2 характеризується трохи нижчою афінністю до VEGF. У Ferrara (Endocrine Rev., 25, 2004, сс. 581-611) представлено докладний опис VEGF, дані про його взаємодію з рецепторами і його функція при нормальних і

15 патологічних процесах описані, наприклад, у Hoeben та ін., Pharmacol. Rev., 56, 2004, сс. 549-580.

Відомо, що VEGF являє собою має вирішальне значення регулятор як нормального, так і аномального ангиогенезу (Ferrara і Davis-Smyth, Endocrine Rev., 18, 1997, сс. 4-25; Ferrara, J. MoL Med., 77, 1999, сс. 527-543). У порівнянні з іншими факторами росту, які беруть участь у

20 процесах формування судин, VEGF є унікальним завдяки його високій специфічності відносно ендотеліальних клітин у судинній системі. У більшості людських пухлин виявлена надекспресія мРНК VEGF. У разі зростання пухлин ангиогенез, мабуть, має вирішальне значення для переходу від гіперплазії до неоплазії і для забезпечення харчування, необхідного для росту і метастазування пухлини (Folkman та ін, Nature 339, 1989, с. 58), що дозволяє пухлинним

25 клітинам набувати переваги з позицій зростання порівняно зі здоровими клітинами. Таким чином, антиангіогенні терапії можуть стати важливим засобом лікування деяких типів пухлин. Ці терапії сфокусовані на блокаді VEGF-шляху (Ferrara та ін., Nat Rev Drug Discov., 3 (5), травень 2004 г., сс. 391-400).

VEGF бере участь також у патогенезі очних хвороб. Виявлено високий рівень кореляції між

30 концентрацією VEGF у очних рідинах і наявністю активної проліферації кровоносних судин у пацієнтів з діабетичними та іншими пов'язаними з ішемією ретинопатіями. Крім того, у сучасних дослідженнях продемонстрована локалізація VEGF у хороїдальних неоваскулярних мембранах у пацієнтів, які страждають віковою дегенерацією жовтої плями (AMD). При різних запальних захворюваннях виявлена також підвищувальна регуляція VEGF. VEGF бере участь у патогенезі

35 ревматоїдного артриту (РА), запального захворювання, у якому ангиогенез відіграє значну роль.

Розкриття ролі VEGF у ангиогенезі і різних процесах свідчить про те, що він являє собою нову потенційну мішень для терапевтичного втручання. Функцію VEGF інгібувати за допомогою

40 малих молекул, які блокують або попереджають активацію рецепторних тирозинкіназ VEGF (Schlaeppli і Wood, Cancer Metastasis Rev., 18, 1999, сс. 473-481) і, як наслідок, надають вплив на шлях трансдукції сигналу рецептора VEGF. Цитотоксичні кон'югати, що містять бактеріальні або рослинні токсини, можуть інгібувати стимулюючу дію VEGF на ангиогенез пухлин. Наприклад, кон'югати VEGF-токсин DT385 (домени дифтерійного токсину, злиті або хімічно кон'юговані із VEGF165), ефективно інгібують ріст пухлин *in vivo*. Інгібування росту пухлин можна здійснювати також шляхом введення мутанта Flk-1 або розчинних VEGF-рецепторів з використанням

45 ретровірусів.

Розроблено нейтралізуючі VEGF антитіла, такі як A4.6.1 і MV833, які блокують зв'язування VEGF з його рецепторами, і у доклінічних дослідженнях була продемонстрована їх протипухлинна активність (Kim та ін, Nature, 362, 1993, сс. 841-844; Folkman Nat. Med., 1, 1995, сс. 27-31; Presta та ін, Cancer Res., 57, 1997, сс. 4593-4599; Kanai та ін, Int. J. Cancer, 77, 1998, сс. 933-936; Ferrara і Alitalo, Nat. Med., 5, 1999, сс. 1359-1364; 320, 340). Огляд досліджень з використанням терапевтичних підходів, заснованих на застосуванні антитіл до VEGF, представлений у Campochiaro і Hackett, Oncogene, 22, 2003, сс. 6537-6548.

У клінічних дослідженнях найбільш вивченим є антитіло A4.6.1, яке також позначають як бевацизумаб (Avastin®; фірма Genentech, Сан-Франциско, шт. Каліфорнія).

55 У WO 2008/101985 описані імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени верблюдових (VHH або «Nanobodies®», представлені у даному описі), які зв'язуються з VEGF, і їх застосування для лікування станів і захворювань, що відрізняються надмірним і / або патологічним ангиогенезом або неоваскуляризацією.

Таким чином, у основу даного винаходу була покладена задача розробити нові ангиогенні

60 зв'язуючі молекули, призначені для лікування людини.

Ще одним об'єктом винаходу є способи попередження, лікування, полегшення і / або діагностування зазначених захворювань, порушень або станів, які у тому, що застосовують або вводять зазначені зв'язуючі молекули і композиції, що їх містять. Зокрема, об'єктом винаходу є зазначені фармакологічно активні зв'язуючі молекули, композиції та / або способи, які мають

переваги у порівнянні з агентами, композиціями та / або методами, які застосовують у даний час і / або які відомі у даній галузі. Зазначені переваги включають покращені терапевтичні та / або фармакологічні властивості і / або інші які мають переваги властивості, наприклад, для цілей виготовлення, насамперед у порівнянні з канонічними антитілами, описаними вище, або їх фрагментами.

Короткий виклад суті винаходу

Першим об'єктом винаходу є біспецифічні зв'язуючі молекули, краще біспецифічні імуноглобуліни, краще імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени типу VHH і доменних антитіл, які містять щонайменше один DLL4-зв'язуючий компонент і щонайменше один Ang2-зв'язуючий компонент у одній молекулі. Ці біспецифічні зв'язуючі молекули можуть краще містити додатковий зв'язуючий компонент, краще компонент, що зв'язує сироватковий альбумін.

Більш конкретно, біспецифічна зв'язуюча молекула, пропонується у винаході, практично містить (I) Ang2-зв'язуючий компонент, який специфічно зв'язується щонайменше з одним епітопом Ang2, і (II) VEGF-зв'язуючий компонент, який специфічно зв'язується щонайменше з одним епітопом VEGF, де компоненти зчеплені один з одним таким чином, що вони одночасно зв'язуються з Ang2 і VEGF або таким чином, що вони зв'язуються у певний момент часу з Ang2 або VEGF.

Таким чином, відповідно до кращих об'єктів винаходу два компоненти містять один або кілька імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів, які можуть незалежно один від одного являти собою VHH або доменні антитіла та / або будь-який інший вид імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів, таких як VL-домени, як вони представлені у даному описі, за умови, що кожний із зазначених імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів повинен зв'язуватися з антигеном, тобто Ang2 або VEGF відповідно.

Згідно кращого варіанта здійснення винаходу імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени відносяться до одного і того ж типу, зокрема, всі імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени являють собою VHH або доменні антитіла.

Згідно з найбільш кращим варіантом здійснення винаходу усі імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени являють собою VHH, краще гуманізовані (або «з оптимізованими послідовностями», як зазначено у даному описі) VHH. Таким чином, винахід відноситься до біспецифічних зв'язуючих молекул, які містять (необов'язково гуманізоване або з оптимізованою послідовністю) антитіло до Ang2 типу VHH (анти-Ang2 VHH) і (необов'язково гуманізоване або з оптимізованою послідовністю) антитіло до VEGF типу VHH (анти-VEGF VHH).

Однак, як має бути очевидно фахівцеві у даній галузі, даний винахід аналогічним чином ставиться до біспецифічних зв'язуючих молекул, які включають інші анти-Ang2 або анти-VEGF імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени, такі як доменні антитіла.

Іншим об'єктом винаходу є нуклеїнові кислоти, що кодують біспецифічні зв'язуючі молекули, пропонується у винаході, а також клітини-хазяїни, які їх містять.

Винахід належить і до продукту або композиції, який / яка містить або являє собою щонайменше одну біспецифічну зв'язуючу молекулу, пропонується у винаході, і необов'язково один або кілька додаткових компонентів зазначеної композиції.

Винахід належить і до способів отримання або створення біспецифічних зв'язуючих молекул, нуклеїнових кислот, клітин-хазяїв, продуктів і композицій, зазначених у цьому описі.

Винахід належить і до варіантів застосування біспецифічних зв'язуючих молекул, нуклеїнових кислот, клітин-хазяїв, продуктів і композицій, зазначених у цьому описі, а також до способів попередження та / або лікування захворювань і порушень, які можна модулювати шляхом інгібування Ang2.

Було встановлено, що Ang2-зв'язуючий компонент біспецифічних зв'язуючих молекул, пропонується у винаході, зв'язується з Ang2 щонайменше у 5000 сильніше, краще у 10000 разів сильніше, ніж з Ang1 або Ang4. Це має у великій мірі дозволяти уникати блокади активації опосередкованої Ang1 передачі сигналів, що може перешкоджати необхідній антиангіогенній дії.

Встановлено також, що VEGF-зв'язуючий компонент біспецифічних зв'язуючих молекул, запропонується у винаході, зв'язується з VEGF-A із афінністю щонайменше у 1000 разів вищою, краще щонайменше у 5000 разів вищою, більш краще щонайменше у 10 тисяч разів більш високою, ніж з VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D або PLGF. Завдяки найбільш вираженому зв'язуванню з VEGF-A не відбувається взаємодії з передачею сигналу VEGFR3, якої модулює ангіогенез

лімфатичних судин.

Кращим варіантом здійснення винаходу є біспецифічні зв'язуючі молекули, запропоновані у даному винаході, у вигляді зчеплених VHH-доменів. Зазначені молекули істотно менше канонічних антитіл і тому можуть глибше проникати у пухлину, ніж зазначені канонічні антитіла.

5 Це корисна властивість додатково посилюється за допомогою специфічних послідовностей, зазначених у цьому описі, після елімінації у них сайтів глікозилювання.

Крім того, завдяки біспецифічній природі (VEGF- і Ang2- зв'язуючі компоненти у одній молекулі) проникнення у пухлину обох функціональностей неминуче має бути однаковим, що повинно гарантувати, що сприятливі дії об'єднаного антагонізму VEGF і Ang2 має поширюватися на всю глибину проникнення у пухлину. Це може бути перевагою у порівнянні з застосуванням комбінації індивідуальних антагоністів до цих мішеней, оскільки глибина проникнення індивідуальних антагоністів завжди може варіюватися у деякій мірі.

10 Іншою перевагою бажаних біспецифічних зв'язуючих молекул, пропонує у даному винаході, є їх більш тривалий час напівжиття у сироватці блягодаря наявності компонента, що зв'язує сироватковий альбумін, такого як зв'язуюча сироватковий альбумін молекула, представлена в даному описі.

Ці та інші об'єкти, варіанти здійснення винаходу, переваги і варіанти застосування винаходу повинні стати більш зрозумілими після ознайомлення з додатково поданим нижче описом.

Визначення

20 Якщо не зазначено або визначено інше, то всі застосовувані поняття вживаються у їх звичайному значенні, прийнятому у даній галузі, яке очевидно фахівцям у даній галузі. Як посилання можна вказати, наприклад, стандартні керівництва, такі як Sambrook та ін., «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», 2-е вид., тому 1-3, вид-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Lewin, «Genes IV», вид-во Oxford University Press, New York, 1990, і Roitt та ін., «Immunology» (2-е вид.), вид-во Gower Medical Publishing, London, New York, 1989, а також документи, що стосуються загального рівня техніки, процитовані у даному описі; крім того, якщо не вказано інше, всі методи, стадії, процеси і маніпуляції, які не описані конкретно у деталях, можна здійснювати (і їх здійснювали) добре відомими методами, що має бути очевидно фахівцеві у даній галузі. І у цьому випадку також у якості посилання можна, наприклад, вказати на відомі керівництва, відомості, що стосуються загального рівня техніки, зазначені вище, і додаткові процитовані у них посилання.

Поняття «біспецифічна зв'язуюча молекула» відноситься до молекули, яка містить щонайменше одну Ang2 зв'язуючу молекулу (або «Ang2-зв'язуючий компонент») і щонайменше одну VEGF-зв'язуючу молекулу (або «VEGF-зв'язуючий компонент»). Біспецифічна зв'язуюча молекула може містити більше однієї Ang2 зв'язуючою молекули і / або більше однієї VEGF-зв'язуючою молекули, що має місце у тому випадку, коли біспецифічна зв'язуюча молекула містить біпаратопну (що буде описано нижче) Ang2-зв'язуючу молекулу і / або біпаратопну VEGF-зв'язуючу молекулу, у тій частині молекули, яка зв'язується з Ang2 або із VEGF тобто у її «Ang2 зв'язуючому компоненті» або (анти-Ang2-компоненті) або «VEGF-зв'язуючому компоненті» (або у анти-VEGF-компоненті) відповідно. Однак поняття «біспецифічний» у цьому контексті не передбачає, що з біспецифічної зв'язуючої молекули виключаються додаткові зв'язуючі компоненти, які мають зв'язуючу специфічність відносно молекул, відмінних від VEGF і Ang2. Прикладами зазначених додаткових зв'язуючих компонентів є (але не обмежуючись лише ними) зв'язуючі компоненти, які зв'язуються з сироватковим альбуміном.

45 Якщо не вказано інше, то поняття «імуноглобулін» і «послідовність імуноглобуліну», якщо їх використовують у контексті даного опису відносно перебуває тільки з важких ланцюгів антитіла або канонічного що складається з 4 ланцюгів антитіла, використовують у якості загальних понять, які включають повнорозмірне антитіло, його індивідуальні ланцюги, а також всі його ділянки, домени або фрагменти (включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) антигензв'язуючі домени або фрагменти, такі як VHH-домени або VH / VL-домени відповідно). Крім того, поняття «послідовність» у контексті даного опису (наприклад, у поняттях типу «послідовність імуноглобуліну», «послідовність антитіла» «послідовність (одиночного) варіабельного домену», «послідовність VHH »або« послідовність білка»), як це зазвичай прийнято, відноситься як до відповідних амінокислотних послідовностей, так і до послідовностей нуклеїнових кислот або нуклеотидних послідовностей, які їх кодують, якщо з контексту не слідує більш обмежена інтерпретація.

Поняття «домен (ділянка)» (поліпептиду або білка) у контексті даного опису відноситься до складчастої білкової структурі, яка має здатність зберігати свою третинну структуру, незалежно від решти частини білка. Як правило, домени відповідальні за окремі функціональні властивості білків і у багатьох випадках їх можна додавати, видаляти або переносити у інші білки без втрати

функції решти білка і / або домену.

Поняття «імуноглобуліновий домен» у контексті даного опису належить до глобулярної ділянки ланцюга антитіла (такий, наприклад, як ланцюг канонічного що складається з 4 ланцюгів антитіла або що складається з важких ланцюгів антитіла) або до поліпептиду, який складається практично з зазначеної глобулярної ділянки. Імуноглобулінові домени відрізняються тим, що вони зберігають притаманну імуноглобуліну складчасту структуру молекул антитіла, яка являє собою 2-шаровий «сендвіч», що складається приблизно з 7 антипаралельних бета-ланцюгів, упакованих у дві бета-складки, необов'язково стабілізованих за допомогою консервативного дисульфідного містка. Імуноглобуліновий домен містить варіабельний (і) домен (и), тобто один або кілька імуноглобулінових варіабельних доменів. Поняття «імуноглобуліновий варіабельний домен (ділянка)» у контексті даного опису належить до імуноглобулінового домену, що складається практично з чотирьох «каркасних ділянок», як вони визначені у даній галузі, і позначені нижче як «каркасна ділянка 1» або «FR1»; «каркасна ділянка 2» або «FR2»; «каркасна ділянка 3» або «FR3» і «каркасна ділянка 4» або «FR4» відповідно; зазначені каркасні ділянки перемежуються трьома «гіперваріабельними ділянками (ділянками, визначальними комплементарністю)» або «CDR», як вони визначені у даній галузі, і позначені нижче як «гіперваріабельна ділянка 1» або «CDR1»; «гіперваріабельна ділянка 2» або «CDR2» і «гіперваріабельна ділянка 3» або «CDR3» відповідно. Таким чином, загальну структуру або послідовність варіабельного домену імуноглобуліну можна позначати як: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. Саме варіабельний (і) домен (и) імуноглобуліну надає (ють) специфічність антитілу відносно антигену, оскільки він (вони) несе (уть) антигензв'язуючий центр. У контексті даного винаходу кращими є імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени типу VHH і доменних антитіл.

Поняття «імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен» у контексті даного опису належить до імуноглобулінового варіабельності домену, який має здатність специфічно зв'язуватися з епітопом антигену без спаровування з додатковим імуноглобуліновим варіабельним доменом. Одним із прикладів імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів відповідно до даного винаходу є «доменні антитіла», такі як поодинокі імуноглобулінові варіабельні домени VH і VL (VH-домени і VL-домени). Іншим прикладом імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів є «VHH-домени» (або просто «VHH») з представників верблюдових, як зазначено нижче у цьому описі.

У світли вищевказаних визначень антигензв'язуючий домен канонічного складається їх 4 ланцюгів антитіла (такого як молекула IgG, IgM, IgA, IgD або IgE; відома у даній галузі) або Fab-фрагмента, F (ab ') 2-фрагмента, Fv-фрагмента, такого як зв'язаний дисульфідним містком Fv або scFv-фрагмент, або димерного антитіла (діабоді) (які всі відомі у даній галузі), виведений із зазначеного канонічного що складається з 4 ланцюгів антитіла, не слід розглядати як імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, оскільки у цих випадках зв'язування з відповідним епітопом антигену у нормі не може здійснюватися за допомогою одного (одиночного) імуноглобулінового домену, а повинно відбуватися за допомогою спарування (асоціації) імуноглобулінових доменів, таких як варіабельні галузі легкого і важкого ланцюгів, тобто за допомогою пари VH-VL імуноглобулінових доменів, які спільно зв'язуються з епітопом відповідного антигену.

«VHH-домени», які позначають також як VHH, V_HH-домени, фрагменти VHH-антитіла і VHH-антитіла, вперше були описані як антигензв'язуючі імуноглобулінові (варіабельні) домени перебувають (тільки) з важких ланцюгів антитіл (тобто «антитіл, у яких відсутні легкі ланцюги»), Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E.B., Bendahman N., Hamers R. в: «Naturally occurring antibodies devoid of light chains»; Nature 363, 1993, сс. 446-448). Поняття «VHH-домен» було вибрано для того, що можна було відрізнити ці варіабельні домени від варіабельних ділянок важких ланцюгів, які присутні у канонічних що складаються з 4 ланцюгів антитіла (вони позначені далі як «VH-домени (ділянки)» або «VH-домени (ділянки)») та від варіабельних ділянок легких ланцюгів, які присутні у канонічних що складаються з 4 ланцюгів антитіла (вони позначені далі як «VL-домени (ділянки)» або «VL-домени (ділянки)»). VHH-домени можуть специфічно зв'язуватися з епітопом без додаткового антигензв'язуючого домену (на відміну від VH-або VL-доменів у канонічному що складається з 4 ланцюгів антитілі, у якому для розпізнавання епітопу потрібна присутність VL-домена у поєднанні з VH-доменом). VHH-домени являють собою невеликі, сильні й ефективні розпізнавальні антиген структури (одиниці), утворені одиничним імуноглобуліновим доменом.

У контексті даного винаходу поняття VHH-домен, VHH, VHH-домен, фрагмент VHH-антитіла, VHH-антитіло, а також «Nanobody®» і «домен Nanobody®» («Nanobody») є товарним знаком компанії Ablynx NV; Гент, Бельгія) застосовують взаємозамінно, і вони відносяться до

імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів (які мають наступну будову: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, і які специфічно зв'язуються з епітопом, не вимагаючи присутності другого імуноглобулінового варіабельного домена), і вони відрізняються від VH-доменів наявністю так званих «відмінних залишків, залишків-маркерів», як вони визначені, наприклад, у WO 2009/109635, фіг. 1.

Амінокислотні залишки імуноглобулінового одиничного варіабельного домену, наприклад, V_HH, нумерують відповідно до загальної номенклатури Кебота для V_H-доменів («Sequence of proteins of immunological interest», вид-во US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, публікація № 91), у тому вигляді, у якому її застосовують для V_HH-доменів верблюдових, наприклад, як продемонстровано на фіг. 2 у Riechmann і Muyldermans, J. Immunol. Methods 231, 1999, сс. 25-38. Відповідно до цієї нумерації:

FR1 містить амінокислотні залишки, присутні у положеннях 1-30,
CDR1 містить амінокислотні залишки, присутні у положеннях 31-35,
FR2 містить амінокислотні залишки, присутні у положеннях 36-49,
CDR2 містить амінокислотні залишки, присутні у положеннях 50-65,
FR3 містить амінокислотні залишки, присутні у положеннях 66-94,
CDR3 містить амінокислотні залишки, присутні у положеннях 95-102 і
FR4 містить амінокислотні залишки, присутні у положеннях 103-113.

Однак слід зазначити, що, як добре відомо у даній галузі, для V_H-доменів і для V_HH-доменів, загальна кількість амінокислотних залишків у кожному CDR може варіюватися і може не відповідати загальній кількості амінокислотних залишків, зазначених у номенклатурі Кебота (тобто одне або кілька положень згідно з номенклатурою Кебота може бути незайнятим у фактичній послідовності, або фактична послідовність може містити більшу кількість амінокислотних залишків, ніж кількість залишків, яке повинно бути присутнім згідно з номенклатурою Кебота). Це означає, що, у цілому, нумерація за Кеботом може як відповідати, так і не відповідати фактичній нумерації амінокислотних залишків у фактичній послідовності.

У даній галузі відомі альтернативні методи нумерації амінокислотних залишків V_H-доменів, зазначені методи також можна застосовувати аналогічним чином до V_HH-доменам. Однак, у даному описі, формулі винаходу і на кресленнях нумерація відповідає номенклатурі Кебота, і її застосовують до описаних вище V_HH-доменів, якщо спеціально не вказано інше.

Загальна кількість амінокислотних залишків у V_HH-домени, як правило, становить від 110 до 120, частіше від 112 до 115. Однак слід зазначити, що для цілей цього винаходу можна застосовувати також як більш короткі, так і більш довгі послідовності.

Імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени (наприклад, V_HH і «домени» антитіла), мають ряд унікальних структурних характеристик і функціональних властивостей, які роблять їх найбільш кращими для застосування у терапії у якості функціональних антигензв'язуючих молекул. Зокрема (але, не обмежуючись тільки цим), V_HH-домени (які «створені» природою таким чином, що вони можуть функціонально зв'язуватися з антигеном без спаровування з варіабельною ділянкою легкого ланцюга) можуть функціонувати як поодинокі відносно дрібні функціональні антигензв'язуючі структурні одиниці.

Завдяки своїм унікальним властивостям імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени, як вони визначені у даному описі, типу V_HH або V_H (або V_L), або індивідуально, або у якості частини більш великого поліпептиду, наприклад біпаратопної молекули, мають ряд важливих переваг:

- тільки один домен необхідний для зв'язування антигену з високою афінністю і високою селективністю, тому відсутній як необхідність у наявності двох окремих доменів, так і необхідність у вимозі, щоб ці два домену перебували у правильній просторовій конформації і конфігурації (тобто необхідність у застосуванні спеціально створених лінкерів, як у випадку scFv);

- імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени можна експресувати з однієї молекули нуклеїнової кислоти і при цьому відсутня необхідність у якій-небудь пост-трансляційній модифікації (типу глікозилювання);

- імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени легко можна конструювати у багатовалентних і мультиспецифічних форматах (що докладно обговорено нижче у даному описі);

- імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени мають високу специфічність і афінність до мішені, низьку притаманну їм токсичність і їх можна вводити шляхами, відмінними від інфузії або ін'єкції;

- імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени мають високу стійкість до нагрівання, pH, протеаз та інших денатуруючих агентів або умовам і тому їх можна отримувати, зберігати або

транспортувати без застосування охолоджуючого устаткування;

- імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени можна легко і відносно дешево отримувати як у лабораторному, так і у промисловому масштабі. Наприклад, імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени можна отримувати з використанням ферментації мікроорганізмів (що більш
5 детально описано нижче) і для цієї мети не потрібно застосування експресійних систем ссавців, що має місце у випадку канонічних антитіл;

- імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени є відносно невеликими (приблизно 15 кДа або у 10 разів менше, ніж канонічний IgG) у порівнянні з канонічними що складаються з 4 ланцюгів антитілами і їх антигензв'язуючими фрагментами, і тому для них характерна висока
10 (більш висока) здатність проникати у тканини (включаючи (але, не обмежуючись лише ними) щільні пухлини та інші щільні тканини) і їх можна вводити у більш високих дозах, ніж дози канонічних що складаються з 4 ланцюгів антитіл і їх антигензв'язуючих фрагментів;

- VHH мають специфічну так звану «здатність зв'язуватися з сайтом, розташованому у ущелині (борозенці)» (у тому числі завдяки їх подовженій CDR3-петлі, на відміну від VH-доменив що складаються з 4 ланцюгів антитіл), і тому для них є доступними також мішені і епітопи, які не
15 доступні для канонічних що складаються з 4 ланцюгів антитіл і їх антигензв'язуючих фрагментів;

- VHH мають важливу перевагу, що полягає у тому, що вони мають високу розчинність і дуже високу стабільність і не мають тенденцію до агрегації (що має місце у випадку отриманих з антитіл мишей антигензв'язуючих доменив, описаних у Ward та ін., Nature 341, 1989, сс. 544-
20 546).

Імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени, пропоновані у винаході, не обмежені будь-яким конкретним біологічним джерелом, з якого їх одержують, або конкретним методом отримання. Наприклад, процес отримання VHH може включати наступні стадії:

(1) виділення VHH-домена з зустрічається у природних умовах містить (тільки) важкі ланцюги антитіла; або скринінг бібліотеки містять (тільки) важкі ланцюги антитіл або VHH, і виділення з них VHH;
25

(2) експресія молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує VHH-домен, що має послідовність, яка зустрічається у природних умовах;

(3) «гуманізація» VHH, необов'язково після дозрівання афінності, за допомогою такої, що має послідовності, що зустрічається у природних умовах, або експресія нуклеїнової кислоти, яка кодує гуманізований VHH;
30

(4) «Камелізація» (відповідно до описаного нижче методу) імуноглобулінового одиничного варіабельного домену важкого ланцюга зустрічається у природних умовах антитіла, отриманого з різних видів тварин, зокрема видів ссавців, таких як людина, або експресія молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує вказаний камелізований домен;
35

(5) «камелізація» VH або експресія молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує камелізований VH;

(6) застосування методик для одержання синтетичних або напівсинтетичних білків, поліпептидів та інших амінокислотних послідовностей;

(7) отримання молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує VHH-домен, за допомогою методів синтезу нуклеїнових кислот з подальшою експресією отриманої таким чином нуклеїнової кислоти;
40

(8) нараження що містять важкі ланцюги антитіл або VHH процесу дозрівання афінності, мутагенезу (наприклад, неспецифічному мутагенезу або сайтнаправленному мутагенезу) та / або будь-який (им) інший (ім) обробці (ам) для підвищення афінності та / або специфічності VHH; та / або
45

(9) поєднання або вибір деяких з вищевикладених стадій.

Прийнятні методи і процеси здійснення зазначених вище стадій відомі у даній галузі і повинні бути очевидні фахівцеві у даній галузі. Наприклад, методи отримання VHH-доменив, які зв'язуються зі специфічним антигеном або епітопом, описані у WO 2006/040153 і WO 2006/122786.
50

Згідно конкретних варіантів здійснення винаходу імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени, пропоновані у винаході, або присутні у поліпептидах, запропонованих у винаході, являють собою VHH-домени, амінокислотна послідовність яких практично відповідає амінокислотній послідовності такого, що зустрічається у природних умовах VHH-домена, але є гуманізованою або має «оптимізовану послідовність» (необов'язково у результаті дозрівання афінності), тобто має (ють) місце заміна (и) одного або декількох амінокислотних залишків у амінокислотній послідовності зазначеного такого, що зустрічається у природних умовах VHH на один або кілька амінокислотних залишків, які перебувають у відповідному (їх) положенні (ях) у варіабельній галузі важкого ланцюга канонічного що складається з 4 ланцюгів людського
60

антитіла. Для цієї мети можна застосовувати методи, відомі у даній галузі, що є загальноприйнятими для фахівця у даній галузі.

Гуманізований VHH-домен може містити одну або кілька послідовностей повністю людських каркасних ділянок і у ще більш конкретному варіанті здійснення винаходу може містити послідовності людських каркасних ділянок, виведені з послідовностей людської зародкової лінії Vh3, таких як DP-29, DP-47, DP 51, або їх частини, або мати високий рівень гомології з ними, необов'язково у поєднанні з JH-послідовностями, такими як JH5. Так, протокол гуманізації може передбачати заміну будь-якого із залишків VHH на відповідні залишки каркасної ділянки 1, 2 і 3 (FR1, FR2 і FR3) генів VH зародкової лінії, таких як DP 47, DP 29 і DP 51, або індивідуально, або у комбінації. Прийнятні каркасні ділянки (FR) імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів, запропонованих у винаході, можна вибирати з ділянок, описаних, наприклад, у WO 2006/004678, і зокрема, вони включають так звані класи «KERE» і «GLEW». Найбільш бажаними є імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени, які мають амінокислотну послідовність GLEW приблизно у положеннях 44-47, і їх відповідні гуманізовані копії. Гуманізований VHH-домен може містити одну або кілька послідовностей повністю людської каркасної ділянки.

Наприклад, застосовувана з метою гуманізації заміна VHH, що належать до 103 P, R, S-групи та / або GLEW-груп (що описано нижче), являє собою заміну 108Q на 108L. Методи гуманізації імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів відомі у даній галузі.

Зв'язуючі імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени з поліпшеними з позицій терапевтичного застосування властивостями, наприклад, мають підвищену афінність або знижену імуногенність, можна отримувати з індивідуальних зв'язуючих молекул за допомогою методик, відомих у даній галузі, таких як дозрівання афінності (наприклад, використовуючи у якості вихідних синтетичні, довільні або що зустрічаються у природних умовах послідовності імуноглобулінів), CDR-трансплантація, гуманізація, об'єднання фрагментів, отриманих з різних послідовностей імуноглобулінів, ПЛП-збірка з використанням праймерів що перекриваються та аналогічні методики, призначені для конструювання послідовностей імуноглобулінів, які добре відомі фахівцям у даній галузі; або будь-якій прийнятній комбінації будь-яких вищевикладених методів, що також позначають поняттям «оптимізація послідовності», вживаним у даному описі. Як посилання можна вказати, наприклад, стандартні посібники, а також можна використовувати приведені нижче опис і відомості, представлені у прикладах.

При необхідності зв'язуючу молекулу, пропоновану у винаході, яка має підвищену афінність, одержують з іншої зв'язуючої молекули шляхом дозрівання афінності, остання являє собою «батьківську» зв'язуючу молекулу щодо молекули з дозрілою афінністю.

Раніше були описані методи отримання VHH, які зв'язуються зі специфічним антигеном або епітопом, див., наприклад, WO 2006/040153 і WO 2006/122786. Як докладно описано у зазначених документах, VHH-домени, виведені з представників верблюдових, можна «гуманізувати» (у контексті даного опису цей процес позначений також як «оптимізація послідовності», при цьому «оптимізація послідовності» крім гуманізації може включати додаткову модифікацію послідовності за допомогою однієї або декількох мутацій, які дозволяють отримувати VHH з поліпшеними властивостями, таких як видалення потенційних сайтів пост-трансляційних модифікацій) шляхом заміни одного або декількох амінокислотних залишків у амінокислотній послідовності вихідної послідовності VHH на один або кілька амінокислотних залишків, які перебувають у відповідному (їх) положенні (ях) у VH-галузі канонічного що складається з 4 ланцюгів людського антитіла. Гуманізований VHH-домен може містити одну або кілька послідовностей повністю людської каркасної ділянки і у більш конкретному варіанті здійснення винаходу може містити послідовності людських каркасних ділянок, виведені з DP-29, DP-47, DP-51, або їх частини, необов'язково у поєднанні з JH-послідовностями, такими як JH5.

«Доменні антитіла», які також позначають як «Dab» або «dAb» (поняття «доменні антитіла» і «dAb» є товарним знаком групи компаній GlaxoSmithKline), описані, наприклад, у Ward ES та ін. в: «Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli», Nature 341, 1989, сс. 544-546; у Holt L.J. та ін. в: «Domain antibodies: proteins for therapy», TRENDS in Biotechnology 21(11), 2003, сс. 484-490 і у WO 2003/002609.

Доменні антитіла у основному відповідають VH-або VL-доменів антитіл з представників ссавців, що не відносяться до верблюдових, зокрема людських що складаються з 4 ланцюгів антитіл. Для додання здатності зв'язуватися з епітопом у вигляді одиничного антигензв'язуючого домену, тобто без спаровування з VL-або VH-доменом відповідно, потрібно здійснювати специфічну селекцію щодо зазначених антигензв'язуючих властивостей, наприклад, з використанням бібліотек людських послідовностей одиничних VH-або VL-доменів.

Доменні антитіла подібно VHH мають молекулярну масу, що становить від приблизно 13 до приблизно 16 кДа, якщо їх виводять з повністю людських послідовностей, і вони не потребують гуманізації, наприклад, для терапевтичного застосування на людях. Також як і у випадку VHH-доменів, їх можна з успіхом експресувати також у прокаріотичних системах експресії, що призводить до істотного зниження загальної вартості виробництва.

Крім того, що також має бути очевидно фахівцеві у даній галузі, можна «трансплантувати» один або кілька зазначених вище CDR у інші «каркаси», включаючи (але, не обмежуючись лише ними) людські каркаси або неімуноглобулінові каркаси. Прийнятні каркаси і методики такої трансплантації CDR відомі у даній галузі.

Поняття «епітоп» і «антигенна детермінанта», які можна застосовувати взаємозамінно, належать до ділянки макромолекули, такої як поліпептид, який розпізнається антигензв'язуючими молекулами, такими як канонічні антитіла або поліпептиди, пропоновані у винаході, і більш конкретно антигензв'язуючими центрами зазначених молекул. Епітопи являють собою мінімальний сайт зв'язування для імуноглобуліну і тому являють собою специфічну мішень для імуноглобуліну.

Вважають, що поліпептид (такий як імуноглобулін, антитіло, імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, пропонований у винаході, або у цілому зв'язуюча молекула або її фрагмент), який може «зв'язуватися з» або «специфічно зв'язуватися з», який має «афінність до» і / або «специфічність до» певного епітопу, антигену або білку (або щонайменше одній його ділянці, фрагменту або епітопу), «діє проти» чи є «спрямованим проти» зазначеного епітопу, антигену або білка, або є «зв'язуючою» молекулою стосовно вказаного епітопу, антигену або білка. У цьому контексті VEGF-зв'язуючий компонент можна позначати також як «VEGF нейтралізуючий» компонент.

Як правило, поняття «специфічність» відноситься до ряду антигенів або епітопів різних типів, з якими конкретна антигензв'язуюча молекула або молекула антигензв'язуючого білка (така як імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, пропонований у винаході) може зв'язуватися. Специфічність антигензв'язуючої молекули можна визначати на основі її афінності та / або авідності. Афінність, що характеризується константною рівновагою реакції дисоціації комплексу антиген: антигензв'язуючий білок (KD), є мірою сили зв'язування між епітопом і антигензв'язуючим центром антигензв'язуючого білка: чим менше величина KD, тим вище сила зв'язування між епітопом і антигензв'язуючою молекулою (в альтернативному варіанті афінність можна виражати у вигляді константи афінності (KA), яка являє собою $1/KD$). Як має бути очевидно фахівцеві у даній галузі (наприклад, після ознайомлення з представленим нижче додатковим описом), афінність можна визначати добре відомим методом у залежності від специфічності антигену який представляє інтерес. Авідність являє собою міру сили зв'язування між антигензв'язуючою молекулою (такий як імуноглобулін, антитіло, імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен або поліпептид, що містить) та відповідним антигеном. Авідність пов'язана як з афінністю між епітопом і його антигензв'язуючим центром антигензв'язуючої молекули, так і з кількістю відповідних сайтів зв'язування, які присутні у антигензв'язуючій молекулі.

Частина антигензв'язуючої молекули, яка розпізнає епітоп, називається паратопом.

Якщо не вказано інше, то поняття «VEGF-зв'язуюча молекула» або «Ang2-зв'язуюча молекула» включає антитіла до VEGF або до Ang2, фрагменти антитіла до VEGF або антитіла до Ang2, «молекули, що нагадують антитіло до VEGF» або «молекули, що нагадують антитіло до Ang2», як вони визначені у даному описі, і кон'югати, що включають будь-яку з них. Антитіла являють собою (але, не обмежуючись лише ними) моноклональні і химерні моноклональні антитіла. Поняття «антитіло» відноситься до повних імуноглобулінів, наприклад, моноклональних антитіл, які отримують шляхом рекомбінантної експресії у клітинах-хазяїнах, а також до фрагментів антитіл або «молекул, що нагадує антитіла», включаючи одноланцюгові антитіла і лінійні антитіла, так звані «SMIP» («Small Modular Immunopharmaceuticals», малі модульні імунофармацевтичні засоби), наприклад, описані у WO 02/056910. Схожі на антитіла молекули включають імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени, представлені у даному описі. Іншими прикладами схожих на антитіла молекул є антитіла з суперсімейства імуноглобулінів (IgSF) або молекули з трансплантованими CDR.

Поняття «Ang2-зв'язуюча молекула» або «VEGF-зв'язуюча молекула» відповідно відноситься як до одновалентних мішеней зв'язуючих молекул (тобто до молекул, які зв'язуються з одним епітопом відповідної мішені), так і до двох-або багатовалентних зв'язуючих молекул (тобто зв'язуючих молекул, які зв'язуються з більш ніж одним епітопом, наприклад, «біпаратопним» молекул, як вони описані нижче). Ang2-(або VEGF)-зв'язуючі молекули, які містять більше одного зв'язується з Ang2 (або VEGF) імуноглобулінового одиничного

варіабельного домену, також позначають як «форматовані» зв'язуючі молекули, вони можуть містити у мішень зв'язуючому компоненті крім імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів також лінкери та / або фрагменти з ефекторними функціями, наприклад, фрагменти, що подовжують час напівжиття, типу альбумінсвязиваючих імуноглобулінових одиничних

5 варіабельних доменів, і / або партеру по злиттю типу сироваткового альбуміну і / або приєднаного полімеру типу ПЕГ.

Поняття «біпаратопна Ang2-(або VEGF)-зв'язуюча молекула» або «біпаратопний імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен» у контексті даного опису означає зв'язуючу молекулу, яка містить перший імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен і другий

10 імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, як вони визначені у даному описі, при цьому дві молекули зв'язуються з двома неперекривними епітопами відповідного антигену. Біпаратопні зв'язуючі молекули складаються з імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів, які мають різні специфічності щодо епітопу. Паратопом називають частину антигензв'язуючої молекули (такої як антитіло або імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен,

15 пропонуваній у винаході), яка розпізнає епітоп.

Форматована зв'язуюча молекула може, хоча це є менш привабливим, містити також два ідентичних імуноглобулінових одиничних варіабельних домену або містити два різних імуноглобулінових одиничних варіабельних домену, які розпізнають один і той же або що перекриваються епітопи або відповідний антиген. У цьому випадку відносно VEGF два

20 імуноглобулінових одиничних варіабельних домену можуть зв'язуватися з одним і тим же або епітопом що перекривається у кожному з двох мономерів, які утворюють димер VEGF.

Як правило, зв'язування зв'язуючих молекул, запропонованих у винаході, характеризується значенням константи дисоціації (K_D), що становить від $10E-5$ до $10E-14$ молей / л (М) або менше, і краще від $10E-7$ до $10E-14$ молей / л (М) або менше, більш краще від $10E-8$ до $10E-14$

25 молей / л і ще більш краще від $10E-11$ до $10E-13$, за даними, отриманими, наприклад, за допомогою Біасоре-або Кінеха-аналізу), та / або значенням констант асоціації (K_A), що становить щонайменше $10E8 M^{-1}$, більш краще щонайменше $10E9 M^{-1}$, наприклад, щонайменше $10E11 M^{-1}$. Як правило, вважається, що будь-яке значення величини K_D , яке перевищує $10E-4$ молей / л, свідчить про неспецифічне зв'язування. Краще зв'язування поліпептиду,

30 запропонованого у винаході, з необхідним антигеном, тобто VEGF або Ang2 відповідно, має характеризуватися значенням K_D , які становлять менше 500нм, краще менше 200нм, більш краще менше 10 нм, наприклад, менш 500пМ. Специфічне зв'язування антигензв'язуючого білка з антигеном або епітопом можна визначати за допомогою будь-якого прийнятного добре відомого методу, такого, наприклад, як аналізи, представлені у даному описі, аналіз Скетчарда

35 та / або аналізи зв'язування у умовах конкуренції (аналізи конкурентного зв'язування), такі як радіоімуноаналізи (RIA), ферментні імуноаналізи (FIA) і «сендвіч»-аналізи у умовах конкуренції і їх різні варіанти, добре відомі у даній галузі.

Амінокислотні залишки позначають відповідно до стандартного трибуквеного або однобуквеного коду амінокислот, що добре відомо і є загальновизнаним у даній галузі. При

40 порівнянні двох амінокислотних послідовностей поняття «відмінність у амінокислотах» відноситься до інсерцій, делецій або заміни зазначеної кількості амінокислотних залишків у певному положенні референс-послідовності у порівнянні з другою послідовністю. У разі заміни (и) зазначені (а) заміни (а) краще повинні (а) являти собою консервативні (у) амінокислотні (ну) заміни (у), це означає, що амінокислотний залишок замінюють на інший амінокислотний

45 залишок схожої хімічної будови, який має незначний вплив або практично не робить впливу на функцію, активність та інугі біологічні властивості поліпептиду. Зазначені консервативні амінокислотні заміни добре відомі у даній галузі, наприклад, вони описані у WO 98/49185, при цьому консервативні амінокислотні заміни краще являють собою заміни, при яких одну з амінокислот з наступних груп (I) - (V) замінюють на інший амінокислотний залишок, що входить

50 у цю ж групу: (I) невеликі аліфатичні неполярні або такі, які мають невисоку полярність залишки: Ala, Ser, Thr, Pro і Gly; (II) полярні негативно заряджені залишки і їх (незаряджені) аміді: Asp, Asn, Glu і Gln; (III) полярні позитивно заряджені залишки: His, Arg і Lys; (IV) великі аліфатичні неполярні залишки: Met, Leu, Ile, Val і Cys; та (V) ароматичні залишки: Phe, Tyr і Trp. Найкращими є наступні амінокислотні заміни: Ala на Gly або на Ser; Arg на Lys; Asn на Gln або

55 на His; Asp на Glu; Cys на Ser; Gln на Asn; Glu на Asp; Gly на Ala або на Pro; His на Asn або на Gln; Ile на Leu або на Val; Leu на Ile або на Val; Lys на Arg, на Gln або на Glu; Met на Leu, на Tyr або на Ile; Phe на Met, на Leu або на Tyr; Ser на Thr; Thr на Ser; Trp на Tyr; Tyr на Trp або на Phe; Val на Ile або на Leu.

Молекула поліпептиду або нуклеїнової кислоти розглядається як «практичні виділена»

60 (знаходиться у «практично виділеній» формі), наприклад, з її нативного біологічного джерела і /

або реакційного середовища або середовища для культивування, з якого її отримують, коли вона відокремлена щонайменше від одного компонента, з яким вона зазвичай асоційована у зазначеному джерелі або вказаному середовищі, такому як інший білок / поліпептид, інша нуклеїнова кислота, інший біологічний компонент або макромолекула або щонайменше один забруднювач, домішок або міnorний компонент. Зокрема, молекула поліпептиду або нуклеїнової кислоти розглядається як «практично виділена», коли ступінь її чистоти підвищена щонайменше у 2 рази, зокрема щонайменше у 10 разів, більш краще щонайменше у 100 разів і аж до 1000 разів або більше. Молекула поліпептиду або нуклеїнової кислоти, яка знаходиться у «практично виділеній формі», краще є практично гомогенною, що визначають за допомогою прийнятного методу, такого як прийнятний хроматографічний аналіз, електрофорез у поліакриламідному гелі.

«Ідентичність послідовностей» послідовностей двох VEGF -зв'язуючих молекул або послідовностей двох Ang2-зв'язуючих молекул означає відсоток амінокислот, ідентичних для послідовностей. Його можна розраховувати або визначати згідно з методом, викладеному у розділі f) на с. 49 та с. 50 WO 2008/020079. «Подібність послідовностей» означає відсоток амінокислот, які або ідентичні, або представляють собою консервативні амінокислотні заміни.

У даній галузі відомі альтернативні методи нумерації амінокислотних залишків VH-доменів, зазначені методи аналогічним чином можна застосовувати для нумерації VHH-доменів. Однак у даному описі, формулі винаходу і на кресленнях, якщо не вказано інше, використовують номенклатуру Кебота для нумерації VHH-доменів, яка описана вище.

VEGF- зв'язуюча молекула або Ang2-зв'язуюча молекула «із дозрілою афінністю», зокрема, VHH або доменне антитіло, несе одну або кілька змін у одному або декількох CDR, що призводить до підвищеної афінності до VEGF або Ang2 порівняно з відповідною батьківської VEGF -зв'язуючою молекулою або Ang2-зв'язуючою молекулою. VEGF -зв'язуючі молекули або Ang2-зв'язуючі молекули з дозрілою афінністю можна отримувати методами, описаними у даній галузі, наприклад, описаними у Marks та ін., Biotechnology 10, 1992, сс. 779-783 або у Barbas та ін., Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91, 1994, сс. 3809-3813.; Shier та ін., Gene 169, 1995, сс. 147-155; Yelton та ін., Immunol. 155, 1995, сс. 1994-2004; Jackson та ін., J. Immunol. 154(7), 1995, сс. 3310-3319 і у Hawkins та ін., J. Mol. Biol. 226(3), 1992, сс. 889-896; у K.S. Johnson і R.E. Hawkins в: «Affinity maturation of antibodies using phage display», вид-во Oxford University Press, 1996.

У контексті даного винаходу «амінокислотні послідовності SEQ ID NO: x» включають, якщо не вказано інше, амінокислотну послідовність, яка на 100% ідентична послідовності, представленої у відповідній SEQ ID NO: x;

а) амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80% ідентичні послідовності, представленої у відповідній SEQ ID NO: x;

б) амінокислотні послідовності, які мають 3, 2 або 1 відмінність у амінокислотах щодо послідовності, представленої у відповідній SEQ ID NO: x.

Поняття «рак» і «злоякісний» відноситься або описує фізіологічний стан у ссавців, що, як правило, характеризується нерегульованим зростанням / проліферацією клітин. Прикладами раку, який можна лікувати за допомогою біспецифічної зв'язуючої молекули, запропонованої у винаході, є (але, не обмежуючись лише ними) карцинома, лімфома, бластома, саркома і лейкоз. Більш конкретними прикладами зазначених видів раку, які запропоновано лікувати за допомогою антагоністів VEGF згідно US 2008/0014196, є плоскоклітинний рак, дрібноклітинний рак легені, недрібноклітинний рак легені, аденокарціноми легені, плоскоклітинна карцинома легені, рак очеревини, печінковоклітинний рак, рак шлунково-кишкової системи, рак підшлункової залози, гліобластома, рак шийки матки, рак яєчника, рак печінки, рак сечового міхура, гепатома, рак молочної залози, рак ободової кишки, колоректальний рак, саркома ендометрію або матки, карцинома слинних залоз, рак нирки, рак передміхурової залози, рак вульви, рак щитовидної залози, карцинома печінки, рак шлунка, меланома і різні види раку голови і шиї. Порушення регуляції ангиогенезу може призводити до багатьох порушень, які можна лікувати за допомогою композицій і способів, запропонованих у винаході. Ці порушення включають як ненеопластичні, так і неопластичні стани. Неопластичні захворювання включають (але, не обмежуючись лише ними) описані вище захворювання.

Ненеопластичні порушення включають (але, не обмежуючись лише ними) порушення, які у US 2008/0014196 запропоновано лікувати за допомогою антагоністів VEGF, а саме, небажану або аберантну гіпертрофію, артрит, ревматоїдний артрит (RA), псоріаз, псоріатичні бляшки, саркоїдоз, атеросклероз, атеросклеротичні бляшки, діабетичні та інугі проліферативні ретинопатії, включаючи ретинопатію недоношених, ретролєтальну фіброплазію, неоваскулярну глаукому, вікову дегенерацію жовтої плями, діабетичний макулярний набряк, неоваскуляризації рогівки, неоваскуляризацію трансплантата рогівки, відторгнення трансплантата рогівки,

ретиальну / хоріоїдальну неоваскуляризацію\, неоваскуляризацію кута ока (почервоніння), очне пов'язане з неоваскуляризацією захворювання, васкулярний рестеноз, артеріовенозні вади розвитку (AVM), менингіому, гемангіому, ангіофібром, гіперлазії щитовидної залози (включаючи хвороба Грейвса), трансплантацію рогівки та іншої тканини, хронічне запалення, запалення легенів, гостре легеневе пошкодження/РДСД (респіраторний дистрес -синдром дорослих) , сепсис, первинну легеневу гіпертензію, злоякісні пульмональні випоти , набряк головного мозку (наприклад, асоційований з гострим «ударом» / закритим ушкодженням голови / травмою), синовиальне запалення , формування паннуса при RA , осифікуючий міозит , гіпертрофічне утворення кісткової тканини , остеоартрит (ОА) , рефрактерний асцит , полікістозне захворювання яєчника , ендометріоз , хвороби, пов'язані з накопиченням рідини у "третьому" просторі організму (панкреатит , компартмент -синдром , опіки , хвороба кишечника), фіброїди матки, передчасні пологи, хронічне запалення, таке як IBD (хвороба Крона і неспецифічний виразковий коліт), відторгнення ниркового алотрансплантату, запальне захворювання кишечника, нефротичний синдром, небажаний або аберантний зріст тканинної маси (неракові походження), суглоби при гемофілічних артропатіях, гіпертрофічні рубці , припинення росту волосся, синдром Ослера-Вебера, гнійну грануломатозну ретроретальну фіброплазію, склеродерму, трахому, васкулярні адгезії, синовіїт, дерматит, преекламсію, асцит, перикардальний випіт (наприклад, асоційований з перикардитом) і плевральний випіт.

Докладний опис винаходу

Першим об'єктом даного винаходу є біспецифічна зв'язуюча молекула, яка містить щонайменше один Ang2- зв'язуючий компонент і щонайменше один VEGF- зв'язуючий компонент.

У кращих варіантах здійснення даного винаходу біспецифічна зв'язуюча молекула містить щонайменше один VEGF-зв'язуючий компонент і щонайменше один Ang2-зв'язуючий компонент, який додатково містить щонайменше ще один зв'язуючий компонент, краще компонент, що зв'язує сироватковий альбумін (молекула, зв'язуюча сироватковий альбумін).

У кращому варіанті здійснення винаходу компонент, що зв'язує сироватковий альбумін, зв'язуючої молекули, пропонуваної у даному винаході, являє собою виділений імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен або поліпептид, що містить один або кілька зазначених імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів, де вказаний імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен складається з чотирьох каркасних ділянок та трьох гіперваріабельних ділянок CDR1, CDR2 і CDR3 відповідно і де вказаний CDR3 має амінокислотну послідовність, вибрану з амінокислотних послідовностей, представлених у SEQ ID NO: 257, 260, 263, 266, 269, 272 або 275.

Більш краще вказаний (і) один або кілька імуноглобуліновий (их) одиничний (их) варіабельний (их) домен (ів) компонента, що зв'язує сироватковий альбумін, містить (ять)

а. CDR3, що має амінокислотну послідовність, вибрану з першої групи амінокислотних послідовностей, представлених у SEQ ID NO: 257, 260, 263, 266, 269, 272 або 275;

б. CDR1, що має амінокислотну послідовність, вибрану з другої групи амінокислотних послідовностей, представлених у SEQ ID NO: 255, 258, 261, 264, 267, 270 або 273;

в. CDR2, що має амінокислотну послідовність, вибрану з другої групи амінокислотних послідовностей, представлених у SEQ ID NO: 256, 259, 262, 265, 268, 271 або 274.

У більш кращому варіанті здійснення винаходу вказаний (і) один або кілька імуноглобуліновий (их) одиничний (их) варіабельний (их) домен (ів) компонента, що зв'язує сироватковий альбумін, являють собою VHH, які краще мають амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO : 98 або 254.

Згідно кращого варіанту здійснення винаходу вказаний Ang2-зв'язуючий компонент і зазначений VEGF зв'язуючий компонент містять щонайменше один Ang2-зв'язуючий імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен і щонайменше один VEGF-зв'язуючий імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен відповідно.

У кращому об'єкті винаходу вказаний Ang2-зв'язуючий компонент і зазначений VEGF зв'язуючий компонент містять щонайменше один Ang2-зв'язуючий імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен і щонайменше один VEGF-зв'язуючий імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен відповідно, при цьому, кожен з імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів містить чотири каркасних ділянки та три гіперваріабельних ділянки CDR1, CDR2 і CDR3 відповідно.

Так, анти-Ang2 та / або анти-VEGF-компонент, що входить у біспецифічні зв'язуючі молекули, пропонувані у винаході, може включати два (чи більше) анти-Ang2 (або анти-VEGF відповідно) імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів, де мішенню імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів є різні епітопи у Ang2 (або VEGF). Таким чином, два імуноглобулінових

одиничних варіабельних домена у біспецифічній зв'язуючій молекулі повинні мати різну антигенну специфічність і отже різні CDR-послідовності.

Зазначені двовалентні зв'язуючі молекули називають також «біпаратопними конструкціями однодомених антитіл (якщо імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени складаються або практично складаються з однодомених антитіл) або» біпаратопними VHH-конструкціями» (якщо імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени складаються або практично складаються з VHH) відповідно, оскільки два імуноглобулінових одиничних варіабельних домена повинні включати два різних паратопу.

У біспецифічній зв'язуючій молекулі, запропонованій у винаході, одна чи обидві зв'язуючі молекули може (уть) бути двовалентним (і); наприклад, VEGF- зв'язуючий компонент може бути біпаратопним і Ang2- зв'язуючий компонент може являти собою один імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, або VEGF- зв'язуючий компонент може являти собою один імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен і Ang2-зв'язуючий компонент може бути біпаратопним.

У біспецифічних зв'язуючих молекулах, запропонованих у винаході, краще VEGF-зв'язуючий компонент містить двовалентний VEGF-зв'язуючий імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, наприклад, біпаратопний VHH.

Зазначений VEGF-зв'язуючий імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен може містити два або більшу кількість VEGF-зв'язуючих VHH, які являють собою:

а) ідентичні VHH, які мають здатність блокувати взаємодію людського рекомбінантного VEGF з людським рекомбінантним VEGFR-2 з рівнем інгібування $\geq 60\%$, або

б) різні VHH, які зв'язуються з неперекривними епітопами VEGF, де щонайменше один VHH має здатність блокувати взаємодію людського рекомбінантного VEGF з людським рекомбінантним VEGFR-2 з рівнем інгібування $\geq 60\%$, і де щонайменше один VHH може блокувати вказане взаємодія з рівнем інгібування $\leq 60\%$.

VEGF-зв'язуючий компонент містить щонайменше варіабельний домен з чотирма каркасними ділянками і трьома гіперваріабельними ділянками CDR1, CDR2 і CDR3 відповідно, де вказаний CDR3 має амінокислотну послідовність Ser Arg Ala Tyr Xaa Ser Xaa Arg Leu Arg Leu Xaa Xaa Thr Tyr Xaa Tyr, представлену у SEQ ID NO: 1, у якій

Xaa у положенні 5 означає Gly або Ala;
Xaa у положенні 7 означає Ser або Gly;
Xaa у положенні 12 означає Gly, Ala або Pro;
Xaa у положенні 13 означає Asp або Gly;
Xaa у положенні 16 означає Asp або Glu; і

при цьому, зазначений VEGF-зв'язуюча молекула має здатність блокувати взаємодію людського рекомбінантного VEGF165 з людським рекомбінантним VEGFR-2 з рівнем інгібування $\geq 60\%$.

Згідно кращого варіанту здійснення винаходу Xaa у положенні 5 позначає Gly, Xaa у положенні 7 позначає Ser, Xaa у положенні 12 позначає Ala і Xaa у положенні 13 позначає Asp.

Зокрема, зазначений CDR3 має послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 2 SRAYGSSRLRLGDTYDY,

SEQ ID NO: 3 SRAYGSSRLRLADTYDY;
SEQ ID NO: 4 SRAYGSSRLRLADTYEY;
SEQ ID NO: 5SRAYGSGRLRLADTYDY;
SEQ ID NO: 6SRAYASSRLRLADTYDY;
SEQ ID NO: 7SRAYGSSRLRLPDYDY;
SEQ ID NO: 8SRAYGSSRLRLPGTYDY.

Згідно конкретних варіантів здійснення винаходу VEGF-зв'язуюча молекула містить один або кілька імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів, кожен з яких містить

а) CDR3, амінокислотна послідовність якого вибрана з першої групи послідовностей, представлених у SEQ ID NO: 2-8;

б) CDR1 і CDR2, амінокислотні послідовності яких входять, як показано у таблиці 3, у число послідовностей, вибраних з другої групи амінокислотних послідовностей, представлених у SEQ ID NO: 9-46, при зазначена друга послідовність містить відповідний CDR3, вибраний з зазначених у підпункті а).

Згідно кращого варіанту здійснення винаходу імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени являють собою VHH.

Згідно конкретних варіантів здійснення винаходу VHH мають амінокислотні послідовності, вибрані з послідовностей, представлених у SEQ ID NO: 9-46.

Відповідно до іншого конкретного варіанту здійснення винаходу VHH мають амінокислотні

послідовності, вибрані з SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 і SEQ ID NO: 25.

Винахід належить і до VEGF-зв'язуючого компоненту, отриманому у результаті дозрівання афінності та / або оптимізації послідовності вищевказаного VHH, наприклад, до VHH, отриманому у результаті оптимізації послідовності VHH, амінокислотна послідовність якого

5 представлена в SEQ ID NO: 18. Прикладами є VHH, які мають амінокислотні послідовності, вибрані з послідовностей, представлених у SEQ ID NO: 47–57.

Згідно з деякими варіантами здійснення винаходу VEGF-зв'язуючий компонент, пропонується у винаході, можна формувати згідно з методом, вказаною у цьому описі, наприклад, він може бути біпартопним або може містити два ідентичних імуноглобулінових

10 одиничних варіабельних домена. Зазначені VEGF-зв'язуючі компоненти можуть містити два або більшу кількість VHH, які являють собою:

а) ідентичні VHH, які мають здатність блокувати взаємодію людського рекомбінантного VEGF з людським рекомбінантним VEGFR-2 з рівнем інгібування $\geq 60\%$, або

б) різні VHH, які зв'язуються з неперекривними епітопами VEGF, де щонайменше один VHH

15 має здатність блокувати взаємодію людського рекомбінантного VEGF з людським рекомбінантним VEGFR-2 з рівнем інгібування $\geq 60\%$, і де зв'язування щонайменше одного VHH може блокувати вказану взаємодію з рівнем інгібування $\leq 60\%$.

Відсоток блокування зазначеної взаємодії з рівнем інгібування $\geq 60\%$ або $\leq 60\%$ відповідно відноситься до рівня інгібування, визначеним за допомогою гомогенного аналізу посиленою за

20 рахунок ефекту близькості люмінесценції (AlphaScreen[®]), конкурентного ELISA, аналізу на основі резонансу плазмона (SPR) (Biacore[®]), які застосовували у прикладах.

Нижче у даному описі активність VHH згідно з підпунктом а), також позначають як «яка блокує рецептор» активність, а активність VHH згідно з підпунктом б) також позначають як «неблокуюча рецептор» активність.

Краще для блокуючих рецептор VHH характерний рівень інгібування $\geq 80\%$, більш краще $\geq 90\%$; найкращі VHH є повними блокаторами рецептора, тобто для них характерний рівень інгібування, що дорівнює 100%.

VEGF-зв'язуючий компонент може містити два або більшу кількість ідентичних VHH, зазначених у підпункті а), вибраних з VHH, амінокислотні послідовності яких представлені у SEQ

30 ID NO: 9-46, або VHH, отриманих у результаті дозрівання афінності та / або оптимізації послідовностей зазначених VHH. VHH можна вибирати з VHH, амінокислотні послідовності яких представлені у SEQ ID NO: 18 або SEQ ID NO: 47–57.

Згідно кращого варіанту здійснення винаходу форматований VEGF-зв'язуючий компонент містить два VHH, кожен з яких має амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO: 57.

У форматуваних VEGF-зв'язуючих компонентах, які містять два різних VHH,

а) вказаний (і) один або кілька VHH, для яких характерний рівень інгібування $\geq 60\%$, вибирають з:

I. VHH, які мають амінокислотну послідовність, вибрану з амінокислотних послідовностей, представлених у SEQ ID NO: 9-46, або

40 II. VHH, які отримані у результаті дозрівання афінності та / або оптимізації послідовності зазначених VHH, і де

б) вказаний (і) один або кілька VHH, для яких характерний рівень інгібування $\leq 60\%$, вибирають з

I. SEQ ID NO: 58–124 або

45 II. VHH, які отримані у результаті дозрівання афінності та / або оптимізації послідовностей зазначених VHH.

Згідно кращого варіанту здійснення винаходу два VHH, які входять до поліпептиду, амінокислотні послідовності яких представлені у SEQ ID NO: 128-168, розділені лінкерними послідовностями, зазначеними у таблиці 15.

У кращому VEGF-зв'язуючому компоненті VHH, зазначений у підпункті а) I., має амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO: 18, і VHH, зазначений у підпункті б) I., має амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO: 64.

В інших кращих VEGF-зв'язуючих компонентах VHH, зазначені у підпункті а) II., Вибирають з VHH, які мають амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO: 47-57, і VHH, зазначені у підпункті б) II., Вибирають з VHH, які мають амінокислотну послідовність,

55 представлену у SEQ ID NO: 125–127.

Найбільш кращим є біпартопний VEGF-зв'язуючий компонент, який містить два VHH, один з яких має амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO: 57, і один з яких має амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO: 127.

60 Ang2-зв'язуючий компонент містить щонайменше варіабельний домен з чотирма каркасами

ділянками і трьома гіперваріабельними ділянками CDR1, CDR2 і CDR3 відповідно, і де вказаний CDR3 має амінокислотну послідовність, вибрану з амінокислотних послідовностей, які представлені у SEQ ID NO: 226, 229, 232, 235, 238, 241, 244, 247, 250 або 253.

Згідно другого об'єкту винаходу вказаний Ang2-зв'язуючий компонент являє собою виділений імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен або поліпептид, що містить один або кілька імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів, де вказаний імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен містить чотири каркасних ділянки та три гіперваріабельних ділянки CDR1, CDR2 і CDR3 відповідно, і де CDR3 має амінокислотну послідовність, вибрану з амінокислотних послідовностей, які представлені у SEQ ID NO: 226, 229, 232, 235, 238, 241, 244, 247, 250 або 253.

Згідно наступного об'єкта винаходу вказаний імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен Ang2-зв'язуючого компонента містить

а) CDR3, що має амінокислотну послідовність, вибрану з першої групи амінокислотних послідовностей, представлених у SEQ ID NO: 226, 229, 232, 235, 238, 241, 244, 247, 250 або 253 (див. також таблицю 49);

б) CDR1, що має амінокислотні послідовності, які входять, як показано у таблиці 36-A, 38-A, 41-A або 45-A, у якості часткової послідовності у послідовність, вибрану з другої групи амінокислотних послідовностей, представлених у SEQ ID NO: 224, 227, 230, 233, 236, 239, 242, 245, 248 або 251 (див. також таблицю 49);

в) CDR2, що має амінокислотні послідовності, які входять, як показано у таблиці 36-A, 38-A, 41-A або 45-A у якості часткової послідовності у послідовність, вибрану з другої групи амінокислотних послідовностей, які представлені у SEQ ID NO: 225, 228, 231, 234, 237, 240, 243, 246, 249 або 252 (див. також таблицю 49).

Краще імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен Ang2-зв'язуючого компонента являє собою VHH, краще має амінокислотну послідовність, вибрану з амінокислотних послідовностей, які представлені у SEQ ID NO: 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222 або 223.

В іншому кращому варіанті здійснення винаходу імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен Ang2-зв'язуючого компонента отримували шляхом дозрівання афінності або гуманізації імуноглобулінового одиничного варіабельного домена згідно з методом, представленим у даному описі.

Аналогічно цьому, даний винахід належить і до VHH, отриманому шляхом дозрівання афінності або гуманізації VHH Ang2-зв'язуючого компонента згідно з методом, який представлений у даному описі.

Даний винахід належить і до Ang2-зв'язуючого VHH, амінокислотна послідовність якого вибрана з амінокислотних послідовностей, представлених у SEQ ID NO: 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222 або 223.

Прийнятними для здійснення процедури дозрівання афінності батьківськими Ang2-зв'язуючими молекулами є, наприклад, описані вище VHH, амінокислотні послідовності яких представлені у SEQ ID NO: 214, 215, 216, 217, 218 або 219.

Таким чином, винахід стосується також Ang2-зв'язуючих молекул, одержаних шляхом дозрівання афінності та / або оптимізації послідовності вищевказаного VHH, наприклад, до VHH, який був отриманий шляхом оптимізації послідовності VHH, що має амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO: 217, 218, 219, 220, 221, 222 або 223. Амінокислотні послідовності, які представляли собою «джерело», що застосовується для створення останніх VHH, представлені у SEQ ID NO: 214, 215 або 261. Крім того, ці амінокислотні послідовності придатні у якості Ang2-зв'язуючих компонентів, які можна застосовувати у зв'язуючих молекулах, пропонуваніх у даному винаході.

Як зазначено у даному описі, зв'язуюча молекула, пропонувана у даному винаході, краще містить щонайменше один компонент, що зв'язує сироватковий альбумін. Так, зокрема, кращі зв'язуючі молекули мають щонайменше один VEGF-зв'язуючий компонент, щонайменше один Ang2-зв'язуючий компонент і щонайменше один компонент, що зв'язує сироватковий альбумін. Порядок зазначених трьох зв'язуючих компонентів може являти собою будь-який можливий порядок, наприклад, порядок, представлений у таблиці 36-B, 38-B, 40, 41-B, 42, 43, 45-B, 46-A або 47-A або на фіг. 20, 23, 27 або 30, наприклад, VEGF -, Ang2-або зв'язуючий сироватковий альбумін компонент може знаходитися на N-кінці або на C-кінці. Зокрема, «1D01» (SEQ ID NO: 214), «11B07», «00027» (SEQ ID NO: 216), «00908», «7G08» (SEQ ID NO: 215), «00919», «00921» (SEQ ID NO: 220), «00928» (SEQ ID NO: 221), «00932», «00933», «00934», «00935», «00936», «00937», «00938» (SEQ ID NO: 222) або «00956» (SEQ ID NO: 223) у таблицях і у описі до креслень позначають Ang2-зв'язуючі компоненти, а «00038» позначає VEGF-зв'язуючий

компонент і «ALB11» позначає компонент, зв'язуючий сироватковий альбумін. Жоден і них не обмежений конкретною послідовністю, а позначає Ang2-, VEGF - і зв'язуючий сироватковий альбумін компонент у цілому, при застосуванні у контексті можливих конструкцій зв'язуючих молекул, пропонуваніх у даному винаході.

Однак краще, щоб компонент, зв'язуючий сироватковий альбумін, знаходився між VEGF - і Ang2-зв'язуючим компонентом (або навпаки), при цьому найбільш краще, щоб щонайменше один VEGF-зв'язуючий компонент знаходився на N-кінці, за ним слідував щонайменше один компонент, зв'язуючий сироватковий альбумін, а потім щонайменше один Ang2-зв'язуючий компонент, розташований на C-кінці. Встановлено, що такий порядок є найкращим. Таким чином, кращим об'єктом даного винаходу є зв'язуючі молекули, які містять щонайменше один VEGF-зв'язуючий компонент, щонайменше один Ang2-зв'язуючий компонент і щонайменше один компонент, зв'язуючий сироватковий альбумін, які мають амінокислотну послідовність, вибрану з амінокислотних послідовностей, представлених у SEQ ID NO: 180-213,

Поняття «щонайменше один» зв'язуючий (VEGF, Ang2 або сироватковий альбумін) компонент при застосуванні у контексті даного опису вказує на те, що зв'язуюча молекула, пропонувана у даному винаході, може містити один, два, три, чотири або п'ять зв'язуючих VEGF, Ang2 та / або сироватковий альбумін компонентів (тобто субстанцій / одиниць), які краще представляють собою імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, вказаний у даному описі.

VEGF- та / або Ang2-зв'язуючі компоненти з поліпшеними з позицій терапевтичного застосування властивостями, наприклад, які мають підвищену афінність або знижену імуногенність, можна отримувати з індивідуальних VEGF-або Ang2-зв'язуючих компонентів за допомогою методик, відомих у даній галузі, таких як дозрівання афінності (наприклад, використовуючи у якості вихідних синтетичні, довільні або що зустрічаються у природних умовах послідовності імуноглобулінів), CDR-трансплантація, гуманізація, об'єднання фрагментів, отриманих з різних послідовностей імуноглобулінів, ПЛР-збірка з використанням що перекриваються праймерів та аналогічні методики, призначені для конструювання послідовностей імуноглобулінів, які добре відомі фахівцю у даній галузі; або будь-якій прийнятній комбінації будь-яких вищевикладених методів, позначених також як «оптимізація послідовностей». У якості посилання можна вказати, наприклад, стандартні посібники, а також можна використовувати приведені нижче опис і відомості, представлені у прикладах.

При необхідності VEGF-або Ang2-зв'язуючий компонент, пропонуваний у винаході, з підвищеною афінністю одержують шляхом дозрівання іншого VEGF-або Ang2-зв'язуючого компонента, останній являє собою «батьківський» VEGF-або Ang2-зв'язуючий компонент щодо молекули з дозрілою афінністю.

В анти-VEGF або анти-Ang2 VHH, запропонованих у винаході, що починаються з EVQ, N-кінцевий залишок E можна замінити на D (що часто призводить до оптимізації послідовності) або він може бути відсутнім (для експресії VHH у *E.coli*). Для форматуваних VEGF-зв'язуючих молекул, це застосовують, як правило, тільки для VHH, розташованих на N-кінці.

Краща (але, не обмежуючись тільки нею) застосовувана з метою гуманізації заміна у VHH-доменах, що належать до 103 P, R, S-групи та / або GLEW-групі (що описано нижче), являє собою заміну 108Q на 108L. Методи гуманізації імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів відомі у даній галузі.

Згідно з іншим варіантом здійснення винаходу імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен являє собою доменне антитіло, представлене у даному описі.

Згідно ще одному варіанту здійснення винаходу репрезентативні представники класу VEGF-та / або Ang2-зв'язуючих імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів, запропонованих у винаході, мають амінокислотні послідовності, які відповідають амінокислотній послідовності такого, що зустрічається у природних умовах VH-домена, який був «камелізований», тобто змінений шляхом заміни одного або декількох амінокислотних залишків у амінокислотній послідовності, що зустрічається у природних умовах варіабельної галузі важкого ланцюга канонічного що складається з 4 ланцюгів антитіла на один або кілька амінокислотних залишків, які перебувають у відповідному (их) положенні (ях) у VH-домені що складається з важкого ланцюга антитіла. Це можна здійснювати добре відомим методом, який очевидний фахівцеві у даній галузі, і додаткову інформацію про який можна взяти з WO 1994/04678. Зазначена «камелізація» може охоплювати головним чином амінокислотні положення, які знаходяться у області контакту VH-VL, і так звані залишки-маркери верблюдових (див., наприклад, також WO 1994/04678). Детальний опис зазначених методів «гуманізації» і «камелізації» і кращі послідовності каркасних ділянок, які придатні для здійснення цих методів, можна додатково взяти з відомостей, представлених на с. 46 та с. 98 WO 2006/040153 і с. 107 WO 2006/122786.

VEGF-зв'язуючі компоненти, пропонувані у винаході, наприклад, імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени, які мають специфічність відносно VEGF, оскільки вони містять один або кілька імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів, специфічно зв'язуються з одним або декількома епітопами молекули VEGF. Вищесказане відноситься і до Ang2-зв'язуючих компонентів, пропонуваних у винаході.

Специфічне зв'язування VEGF-зв'язуючого компонента з антигеном VEGF можна визначати за допомогою будь-якого прийнятного добре відомого методу, включаючи, наприклад, представлені у даному описі методи, такі як аналіз Скетчарда та / або аналізи зв'язування у умовах конкуренції, такі як радіоімуноаналізи (RIA), ферментні імуноаналізи (FIA та ELISA) та конкурентні «сендвіч»-аналізи і їх різні варіанти, добре відомі у даній галузі. Це ж відноситься до визначення зв'язування Ang2-зв'язуючого компонента з його антигеном.

Відносно антигену VEGF VEGF-зв'язуючий компонент, пропонуваний у винаході, наприклад, імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, не обмежений походженням з якого-небудь конкретного виду. Так, імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени, пропонувані у винаході, краще зв'язуються з людським VEGF, якщо вони призначені для лікування людини. Однак імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени, які зв'язуються з VEGF з інших видів ссавців, також підпадають під обсяг винаходу. Імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, пропонуваний у винаході, який зв'язується з VEGF з одного з видів, може володіти перехресної реактивності із VEGF, який має послідовність, відмінну від людської, з одного або декількох інших видів. Наприклад, імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени, пропонувані у винаході, які зв'язуються з людським VEGF, можуть мати перехресної реактивності із VEGF з одного або декількох інших видів приматів і / або VEGF з одного або декількох видів тварин, яких використовують у якості тварин, на яких моделюють захворювання, наприклад, мавп, мишей, щурів, кроликів, свиней, собак, і, зокрема з тварин, на яких моделюють захворювання і порушення, асоційовані з опосередковуваними VEGF діями на ангіогенез (наприклад, у якості видів і тварин моделей, згаданих у цьому описі). Імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени, пропонувані у винаході, які мають зазначену перехресну реактивність, є важливими для дослідницьких цілей та / або для розробки лікарських засобів, оскільки дозволяють тестувати імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени, пропонувані у винаході, на визначених моделях захворювань, створених на таких тваринах як мавпи, зокрема мавпи ціномолгус або макак резус, або миші і щури.

У світлі перехресної реактивності з однією або декількома молекулами VEGF з видів, відмінних від людини, яка (і) призначена (ни) для застосування на тваринній моделі при розробці терапевтичного антагоніста VEGF, є кращим, коли VEGF-зв'язуючий компонент розпізнає епітоп у тій області який представляє інтерес VEGF, яка має високий ступінь ідентичності з людським VEGF.

Імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, пропонуваний у винаході, розпізнає епітоп, який повністю або частково локалізовано у галузі VEGF, яка придатна для зв'язування з його рецептором, зокрема з VEGFR-2, який, як встановлено, є рецептором, активація якого обумовлює неоваскуляризацію пухлин. Згідно кращих об'єктів винаходу імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени, пропонувані у винаході, блокують активацію VEGF-рецептора, зокрема активацію VEGFR-2, щонайменше частково, краще у значній мірі і найкраще повністю.

Як зазначено вище, здатність VEGF-зв'язуючого компонента блокувати взаємодію між VEGF і його рецепторами, зокрема, VEGFR-2, можна визначати за допомогою гомогенного аналізу посиленою за рахунок ефекту близькості люмінесценції (AlphaScreen[®]), конкурентного ELISA або аналізу на основі резонансу плазмона (SPR) (Biacore[®]), які описані у прикладах.

Краще зв'язування імуноглобулінового одиничного варіабельного домена, пропонуваного у винаході, із VEGF характеризується величиною афінності, що становить менше 500нм, краще менше 200нм, більш краще менше 10 нм, наприклад, менш 500пМ (що визначають за допомогою аналізу на основі резонансу поверхневого плазмона описаного у прикладі 5.7) . Вищесказане відноситься і до зв'язування імуноглобулінового одиничного варіабельного домена, пропонуваного у винаході, із ангіопетину.

Краще для імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів, запропонованих у винаході, характерні величини IC₅₀, виміряні за допомогою конкурентного ELISA, який описаний у прикладі 5.1, що становлять від 10⁻⁶ до 10⁻¹⁰ молей / л або менше, більш краще від 10⁻⁸ до 10⁻¹⁰ молей / л або менше і ще більш краще від 10⁻⁹ до 10⁻¹⁰ молей/л або менше.

Згідно кращого варіанту здійснення винаходу який не обмежує обсяг винаходу зв'язування з VEGF VEGF-зв'язуючих імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів, запропонованих у винаході, характеризується величиною константи дисоціації (KD), що становить від 10⁻⁵ до 10⁻¹² молей/л (M) або менше і краще від 10⁻⁷ до 10⁻¹² молей/л (M) або менш і більш краще від 10⁻⁸

до 10^{-12} молей/л (М), та / або величиною константи асоціації (K_A), що становить щонайменше $10^7 M^{-1}$, краще щонайменше $10^8 M^{-1}$, більш краще щонайменше $10^9 M^{-1}$, наприклад, щонайменше $10^{12} M^{-1}$; і зокрема, величиною K_D , що становить менш 500нм, краще менш 200нм, більш краще менш 10 нм, наприклад, менш 500пм. Таким чином, можна визначати величини K_D і K_A імуноглобулінового одиничного варіабельного домена, пропонованого у винаході, що характеризують зв'язування з VEGF. Зазначене відноситься і до зв'язуючого Ang2 імуноглобулінового одиничного варіабельності домену, пропонованого у винаході.

Біпаратопні VEGF-зв'язуючі компоненти, які містять два чи більше імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів, практично складаються з або містять (I) перший імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, специфічно зв'язується з першим епітопом VEGF, і (II) другий імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, специфічно зв'язується з другим епітопом VEGF, де перший епітоп VEGF і другий епітоп VEGF не є ідентичними епітопами. Іншими словами, вказаний поліпептид, пропонований у винаході, містить або практично складається з двох або більшої кількості імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів, мішенню яких є по меншій два неперекривних епітопу, присутніх у VEGF, при цьому зазначені імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени пов'язані один з одним таким чином, щоб вони могли одночасно зв'язуватися з VEGF. У цьому плані поліпептид, пропонований у винаході, можна розглядати як «двовалентну» або «багатовалентну» імуноглобулінову конструкцію і перш за все як «багатовалентну конструкцію імуноглобулінового одиничного варіабельного домена», якщо поліпептид містить щонайменше два сайти зв'язування з VEGF. (Зазначені конструкції також позначають як «форматовані» VEGF-зв'язуючі молекули, наприклад, «форматовані» VHH). З відповідними змінами вказане належить і до біпаратопних Ang2-зв'язуючих компонентів.

Зазначений VEGF-або Ang2-зв'язуючий компонент, пропонований у винаході, включає (щонайменше) два анти-VEGF або анти-Ang2 імуноглобулінових одиничних варіабельних домена, при цьому мішенню (зазначених) двох імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів краще є неперекривні епітопи молекули VEGF або молекули ангіопетину відповідно. Таким чином, ці два імуноглобулінових одиничних варіабельних домена повинні володіти специфічністю відносно різних антигенів і тому містити різні CDR-послідовності. З цієї причини зазначені поліпептиди, пропоновані у винаході, у контексті даного опису можна позначати також як «біпаратопні поліпептиди» або «біпаратопні конструкції доменних антитіл» (якщо імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени складаються або практично складаються з доменних антитіл), або «біпаратопні VHH-конструкції» (якщо імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени складаються або практично складаються з VHH) відповідно, оскільки два імуноглобулінових одиничних варіабельних домена повинні включати два різних паратопа.

Якщо поліпептид, пропонований у винаході, являє собою біпаратопну молекулу, зазначену у цьому описі, то щонайменше один з компонентів імуноглобулінового одиничного варіабельного домена зв'язується з епітопом таким чином, що взаємодія між рекомбінантним людським VEGF і рекомбінантним людським VEGFR-2 блокується, що характеризується рівнем інгібування $\geq 80\%$. Як продемонстровано у експериментах, описаних у винаході, певні форматовані молекули містять два VHH, які обидва блокують рецептор VEGFR2, що характеризується рівнем інгібування $\geq 80\%$. Певні VHH, пропоновані у винаході, блокують VEGFR-2 з рівнем інгібування 100%, тобто вони є повними блокаторами.

В обох випадках додаткові послідовності і фрагменти можуть бути присутніми у VEGF-зв'язуючих молекулах, запропонованих у винаході, наприклад, на N-кінці, C-кінці або вони можуть бути локалізовані між двома імуноглобуліновими одиничними варіабельними доменами, наприклад, лінкерні послідовності і послідовності, що забезпечують ефекторні функції, які більш детально описані нижче.

Відповідно до іншого, хоча і менш кращого варіанту здійснення винаходу, VEGF-зв'язуючий компонент, пропонований у винаході, може включати більше двох анти-VEGF імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів, тобто три, чотири або навіть ще більша кількість анти-VEGF VHH. У цьому випадку щонайменше два з анти-VEGF імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів спрямовані проти неперекривних епітопів всередині молекули VEGF, а будь-який додатковий імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен може зв'язуватися з будь-яким з двох неперекривних епітопів та / або додатковим епітопом, який присутній у молекулі VEGF.

Згідно винаходу два чи більше імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів можуть незалежно один від одного являти собою VHH або доменні антитіла та / або будь-який інший вид імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів, таких як VL-домени, зазначені у цьому описі, за умови, що ці імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени повинні зв'язуватися з

антигеном, тобто VEGF або ангіопоетіном відповідно.

Детальний опис зв'язуючих компонентів представлено у основному для VEGF-зв'язуючого компонента. Однак всі особливості і характеристики, представлені у даному описі для VEGF-зв'язуючого компонента, відносяться також (після внесення відповідних змін) і до Ang2-зв'язуючого компоненту.

Згідно кращого варіанту здійснення винаходу зв'язуючі молекули, присутні у біспецифічних зв'язуючих молекулах (Ang2-зв'язуючі молекули у Ang2-зв'язуючому компоненті або VEGF-зв'язуючі молекули у VEGF-зв'язуючому компоненті або два суміжних Ang2-і VEGF-зв'язуючих компонента), можна з'єднувати один з одним безпосередньо (тобто без застосування лінкера) або через лінкер. Лінкер краще являє собою пептидний лінкер і його вибирають так, щоб він давав зв'язуватися двом різним зв'язуючим молекулам з кожним з неперекривних епітопів на мішенях, які присутні або у одній і тій же молекулі-мішені, або у двох різних молекулах.

У разі біпаратонних зв'язуючих молекул вибір лінкерів для Ang2-або VEGF-зв'язуючого компонента залежить серед іншого від епітопів і, зокрема, відстані між епітопами на мішені, з якими зв'язуються імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени, і очевидний для фахівця у даній галузі на основі даного опису, необов'язково після проведення обмеженої кількості деяких рутинних експериментів.

Дві зв'язуючі молекули (два VHH або доменних антитіла або VHH і доменне антитіло) або два зв'язуючих компонента можна з'єднувати один з одним через додатковий VHH або доменне антитіло відповідно (в таких зв'язуючих молекулах два чи більше імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів можна з'єднувати безпосередньо з додатковим імуноглобуліновим одиничним варіабільним доменом або за допомогою прийнятих лінкерів). Зазначені додаткові VHH або доменні антитіла можуть, наприклад, являти собою VHH або доменне антитіло, які забезпечують збільшений час напівжиття. Наприклад, останній VHH або останнє доменне антитіло може являти собою конструкцію, яка має здатність зв'язуватися з (людським) сироватковим білком, таким як (людський) сироватковий альбумін або (людський) трансферин.

Альтернативно цьому, два чи більше імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів, які зв'язуються з відповідною мішенню, можна з'єднувати у серії (або безпосередньо, або за допомогою прийнятного лінкера) і додатковий VHH або додаткове доменне антитіло (які можуть забезпечувати збільшений час напівжиття) можна з'єднувати безпосередньо або за допомогою лінкера з однією з цих двох або більшої кількості вищевказаних імуноглобулінових послідовностей.

Прийнятні лінкери представлені у даному описі у поєднанні зі специфічними поліпептидами, пропонованими у винаході, і вони можуть, наприклад, містити (але, не обмежуючись тільки нею) амінокислотну послідовність, при цьому амінокислотна послідовність краще складається з 9 або більшої кількості амінокислот, більш краще по щонайменше з 17 амінокислот, наприклад, приблизно з 20-40 амінокислот. Однак, хоча верхня межа не має вирішального значення, але її вибирають, виходячи з міркувань придатності, наприклад, для біофармацевтичного виробництва таких поліпептидів.

Лінкерна послідовність може являти собою послідовність, що зустрічається у природних умовах або послідовність, що не зустрічається у природних умовах. Для застосування у терапевтичних цілях лінкер краще є неімуногенним для індивідуума, якому вводять біспецифічну зв'язуючу молекулу, проповану у винаході.

Однією з придатних груп лінкерних послідовностей є лінкери, виведені з шарнірної галузі важкого ланцюга антитіл, описані в WO 1996/34103 і WO 1994/04678.

Іншими прикладами є поліаланінові лінкерні послідовності, такі як Ala-Ala-Ala.

Іншими кращими прикладами лінкерних послідовностей є Gly / Se-лінкери різної довжини, такі як $(\text{gly}_x\text{ser}_y)_z$ -лінкери, включаючи $(\text{gly}_4\text{ser})_3$, $(\text{gly}_4\text{ser})_4$, (gly_4ser) , (gly_3ser) , gly_3 і $(\text{gly}_3\text{ser}_2)_3$.

Деякі приклади лінкерів, які не обмежують обсяг винаходу, представлені у таблиці 15 (SEQ ID NO: 128 - 168), наприклад, лінкери

GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (35GS; SEQ ID NO: 169);

GGGGSGGGGS (9GS; SEQ ID NO: 170);

GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (40GS; SEQ ID NO: 171).

Якщо біспецифічну зв'язуючу молекулу модифікують за допомогою приєднання полімеру, наприклад, поліетіленглікольного (ПЕГ) (поліетіленгліколь) фрагмента, то лінкерна послідовність краще включає амінокислотний залишок, такої як цистеїн або лізин, що дозволяє здійснювати модифікацію, наприклад, ПЕГілювання у лінкерній галузі.

Прикладами лінкерів, придатних для ПЕГілювання, є:

GGGGCGGGGS ("GS9,C5", SEQ ID NO: 172),

GGGGCGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS («GS25,C5», SEQ ID NO:173),

GGGSGGGSGGGGCGGGSGGGSGGGSGGG («GS27,C14», SEQ ID NO:174),
 GGGSGGGSGGGGCGGGSGGGSGGGSGGGSGGG («GS35,C15», SEQ ID NO:175) і
 GGGGCGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG («GS35,C5», SEQ ID NO:176).

Крім того, лінкер може являти собою також полі (етилєнєлієольний) фрагмент, що описано, наприклад, у WO 2004/081026.

В іншому варіанті здійснення винаходу імуноєлобулінові поодинокі варіабельні домени з'єднані один з одним через інший фрагмент (необов'язково за допомогою одного або двох лінкерів), такий як інший поліпептид, який у кращому, але не обмежуючому обсяє винаходу варіанті здійснення винаходу, може являти собою додатковий імуноєлобуліновий одиничний варіабельний домен, описаний вище. Зазначений фрагмент може або бути практично неактивним, або може мати біолоєічну активність, такою як поліпшення необхідних властивостей поліпептиду, або може надавати поліпептиду одне або кілька додаткових необхідних властивостей. Наприклад, фрагмент може (але, не обмежуючись тільки цим) подовжувати час напівжиття білка або поліпептиду і / або знижувати їх імуноєенність або покращувати будь-яку іншу необхідну властивість.

Згідно кращого варіанта здійснення винаходу біспеціфічна зв'язуюча молекула, пропонована у винаході, включає, перш за все, якщо вона призначена для застосування або її застосовують у якості терапевтичного агента, фрагмент, який подовжує час напівжиття поліпептиду, пропонованого у винаході, у сироватці або іншій спільній воді організму пацієнта. Поняття «час напівжиття» визначають як час, необхідний для зниження концентрації (модифікованого) поліпептиду на 50% *in vivo*, наприклад, у результаті розщеплення поліпептиду і / або кліренсу, та / або секвестрування за допомогою природних механізмів.

Більш конкретно, зазначений подовжуючий час напівжиття фрагмент можна ковалентно пов'язувати або зливати з імуноєлобуліновим одиничним варіабельним доменом, і він може являти собою (але, не обмежуючись лише ними) Fc-ділянку, залишок альбуміну, фрагмент залишку альбуміну, альбумінзв'язуючий залишок, такий як імуноєлобуліновий одиничний варіабельний домен антитіла до альбуміну, трансферинзв'язуючий залишок, такий як імуноєлобуліновий одиничний варіабельний домен антитіла до трансферину, поліоксіалкіленову молекулу, таку як, молекула поліетилєнєлієольу, альбумінзв'язуючий пептид або похідне гідроксіетилєрохмалю (HES).

В іншому варіанті здійснення винаходу біспеціфічна зв'язуюча молекула, пропонована у винаході, містить фрагмент, який зв'язується з антиєеном, присутнім у крові, таким як сироватковий альбумін, сироваткові імуноєлобуліни, тироксинзв'язуючий білок, фібриноєен або трансферин, що подовжує час напівжиття *in vivo* утвореного поліпептиду, пропонованого у винаході. Згідно конкретного кращого варіанта здійснення винаходу зазначений фрагмент являє собою альбумінзв'язуючий імуноєлобулін і найбільш краще альбумінзв'язуючий імуноєлобуліновий одиничний варіабельний домен, такий як альбумінзв'язуючий VHH-домен.

Зазначений альбумінзв'язуючий імуноєлобуліновий одиничний варіабельний домен, якщо він призначений для застосування на людях, краще зв'язується з людським сироватковим альбуміном і краще являє собою гуманізований альбумінзв'язуючий VHH-домен.

Імуноєлобулінові поодинокі варіабельні домени, які зв'язуються з людським сироватковим альбуміном, відомі у даній галузі і описані більш детально, наприклад, у WO 2006/122786. Зокрема, придатний для зв'язування з VHH альбумін являє собою ALB 1 і його гуманізовані копію ALB 8 (WO 2009/095489). Однак можна також з успіхом застосовувати інші альбумінзв'язуючі VHH-домени, згадані у вищевказаній патентній публікації.

Найбільш прийнятним альбумінзв'язуючим VHH-доменом є ALB8, який складається з або містить амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO: 98 або 254.

Згідно з іншим варіантом здійснення винаходу два імуноєлобулінових одиничних варіабельних домени, краще VHH, можна зливати з молекулою сироваткового альбуміну, як це описано, наприклад, у WO 2001/79271 і WO 2003/59934. Наприклад, відповідно до підходу, викладеному у WO 2001/79271, злитий білок можна отримувати за допомогою загальноприйнятої методики рекомбінації: молекулу ДНК, що кодує сироватковий альбумін, або її фрагмент пов'язують з ДНК, що кодує біспеціфічну зв'язуючу молекулу, одержану конструкцію вбудовують у плазміду, яку можна застосовувати для експресії у обраній клітині-хазяїні, наприклад, у клітині дріжджів типу *Pichia pastoris*, або у бактеріальній клітині, і потім клітину-хазяїна трансфектувати зливою нуклеотидною послідовністю і вирощувати у прийнятних умовах. Послідовність людського сироваткового альбуміну (ЧСА), яку можна застосовувати, представлена в SEQ ID NO: 99.

Згідно з іншим варіантом здійснення винаходу призводить до подовження часу напівжиття модифікація поліпептиду, пропонованого у винаході (зазначена модифікація знижує також

імуногенність поліпептиду), полягає у приєднанні придатного фармакологічно прийнятного полімеру, такого як полі (етиленгліколь) (ПЕГ) з прямим або розгалуженим ланцюгом або його похідні (наприклад, метоксіполі (етиленгліколь) або мПЕГ). Як правило, можна використовувати будь-яку прийнятну форму ПЕГілювання, таку як ПЕГілювання, відоме у цій галузі для антитіл і

фрагментів антитіл (включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) доменні антитіла і scFv-фрагменти); у якості посилення можна вказати, наприклад, Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 2002, сс. 531-545; Veronese і Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 2003, сс. 453-456; і Chess, Nat. Rev. Drug Discov. 2, 2003 і WO 2004/060965.

Крім того, у продаж надходять різні реагенти для ПЕГілювання поліпептидів, наприклад, від

фірм Nektar Therapeutics, США або NOF Corporation, Японія, такі як серії Sunbright® EA, серії SH, серії MA, серії CA і серії ME, такі як Sunbright® ME-100MA, Sunbright® ME-200MA і Sunbright® ME-400MA.

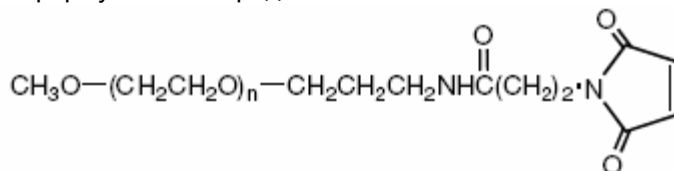
Краще застосовують сайтнаправлене ПЕГілювання, зокрема через залишок цистеїну (див., наприклад, Yang та ін., Protein Engineering 16, 2003, сс. 761-770). Наприклад, для цієї мети ПЕГ можна приєднувати до залишку цистеїну, який у природних умовах присутній у поліпептиді, пропонуваному у винаході, поліпептид, пропонуваний у винаході, можна модифікувати так, щоб у нього можна було вводити один або кілька залишків цистеїну для приєднання ПЕГ, або амінокислотну послідовність, яка містить один або кілька залишків цистеїну, призначених для приєднання ПЕГ, можна зливати з N-і / або C кінцем поліпептиду, пропонуваного у винаході, для всіх зазначених підходів можна застосовувати методики конструювання білків, добре відомі фахівцю у даній галузі.

Краще для поліпептидів, запропонованих у винаході, застосовують ПЕГ з молекулярною масою, що перевищує 5 кДа, наприклад перевищує 10 кДа, але більш низькою ніж 200 кДа, наприклад, більш низькою ніж 100 кДа; наприклад, що становить від 20 до 80 кДа.

Відносно ПЕГілювання слід вказати, що, як правило, винахід належить і до будь-біспецифічної зв'язуючої молекули, яка ПЕГільована у одному або декількох амінокислотних положеннях, краще таким чином, що ПЕГілювання (1) або подовжує час напівжиття *in vivo*; (2) або знижує імуногенність, (3) або забезпечує одне або кілька додаткових цінних властивостей, добре відомих для ПЕГілювання; (4) або не робить істотного впливу на афінність поліпептиду з його мішенню (наприклад, не знижує зазначену афінність більш ніж на 50% і більш краще більш ніж на 10% при визначенні за допомогою прийнятного аналізу, описаного у даній галузі); та / або (5) або не робить впливу на будь-яке інше з необхідних властивостей біспецифічних зв'язуючих молекул, запропонованих у винаході. Прийнятні ПЕГ-групи та методи їх приєднання, або специфічні, або неспецифічні, добре відомі фахівцеві у даній галузі. Крім того, у продаж надходять різні реагенти для ПЕГілювання поліпептидів, наприклад, від фірм Nektar Therapeutics, США або NOF Corporation, Японія, такі як серії Sunbright® EA, серії SH, серії MA, серії CA і серії ME, такі як Sunbright® ME-100MA, Sunbright® ME-200MA і Sunbright® ME-400MA.

Відповідно до найкращого варіанта здійснення винаходу ПЕГільований поліпептид, пропонуваний у винаході, включає один ПЕГ-фрагмент лінійного ПЕГ з молекулярною масою 40 або 60 кДа, при цьому ПЕГ-фрагмент приєднаний до поліпептиду у лінкерній ділянці і, зокрема, до залишку Cys у положенні 5 лінкерного пептиду GS9, представленого у SEQ ID NO: 93, у положенні 14 лінкерного пептиду GS27, представленого у SEQ ID NO: 95, або у положенні 15 лінкерного пептиду GS35, представленого у SEQ ID NO: 96, або у положенні 5 лінкерного пептиду 35GS, представленого у SEQ ID NO: 97.

Біспецифічну зв'язуючу молекулу, пропонувану у винаході, можна ПЕГілювати за допомогою одного із зазначених вище реагентів для ПЕГілювання, такого як «Sunbright® ME-400MA», хімічна формула якого представлена нижче:



Біспецифічні зв'язуючі молекули, які містять лінкер та / або забезпечують подовження часу напівжиття функціональні групи, мають послідовності, представлені у SEQ ID NO: 81 і на фіг. 48.

Згідно з іншим варіантом здійснення винаходу імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени являють собою доменні антитіла, як вони визначені у контексті даного опису.

Імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени, які присутні у біспецифічних зв'язуючих молекулах, запропонованих у винаході, можуть мати також послідовності, які відповідають VH-домени, що зустрічається у природних умовах який був «камелізований», тобто змінений шляхом заміни одного або декількох амінокислотних залишків у амінокислотній послідовності,

що зустрічається у природних умовах варіабельної ділянки важкого ланцюга канонічного що складається з 4 ланцюгів антитіла на один або кілька амінокислотних залишків, які перебувають у відповідному (їх) положенні (ях) у VHH-домені що складається з важкого ланцюга антитіла. Це можна здійснювати добре відомим методом, який очевидний фахівцеві у даній галузі, додаткову інформацію про який можна почерпнути з WO 94/04678. Зазначена «камелізація» може охоплювати головним чином амінокислотні положення, які знаходяться у області контакту VH-VL, і так звані залишки-маркери верблюдових (див., наприклад, також WO 94/04678). Детальний опис зазначених методів «гуманізації» і «камелізації» і переважні послідовності каркасних ділянок, які придатні для здійснення цих методів, можна додатково почерпнути з відомостей, представлених на с. 46 і с. 98 WO 2006/040153 і с. 107 WO 2006/122786.

Зв'язуючі компоненти мають специфічність відносно Ang2 або VEGF відповідно, оскільки у кращому варіанті здійснення винаходу вони містять один або кілька імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів, які специфічно зв'язуються з одним або декількома епітопами молекули Ang2 або молекули VEGF відповідно.

Специфічне зв'язування зв'язуючої молекули з антигеном Ang2 або VEGF можна визначати за допомогою будь-якого прийнятого добре відомого методу, включаючи, наприклад, представлені у даному описі методи, такі як аналіз Скетчарда та / або аналізи зв'язування у умовах конкуренції, такі як радіоімуноаналізи (PIA), ферментні імуноаналізи (FIA та ELISA) і «сенвіч»-аналізи у умовах конкуренції, і їх різні варіанти, добре відомі у даній галузі.

Відносно антигену Ang2 або VEGF відповідно імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен не обмежений походженням з якого-небудь конкретного виду. Так, імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени краще зв'язуються з людським Ang2 чи людським VEGF відповідно, якщо вони призначені для лікування людини. При цьому імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени, які зв'язуються з Ang2 або VEGF відповідно з інших видів ссавців, або поліпептиди, що містять їх, також підпадають під обсяг винаходу. Імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, який зв'язується з Ang2 або VEGF з одного з видів, може давати перехресну реакцію з відповідним антигеном з одного або декількох інших видів. Наприклад, імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени, які зв'язуються з людським антигеном, можуть мати перехресну реактивність з відповідним антигеном з одного або декількох інших видів приматів і / або антигеном з одного або декількох видів тварин, яких застосовують як тварин, на яких моделюють захворювання, наприклад, мавп (зокрема ціномолгус або макака резус), мишей, щурів, кроликів, свиней, собак), зокрема з тварин, на яких моделюють захворювання і порушення, які можна модулювати шляхом інгібування Ang2 (наприклад, у якості видів і тварин моделей, згаданих у цьому описі). Імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени, пропонувані у винаході, які мають зазначену перехресну реактивність, є важливими для дослідницьких цілей і / або для розробки лікарських засобів, оскільки дозволяють тестувати імуноглобулінові поодинокі варіабельні домени, пропонувані у винаході, на визначених моделях захворювань, створених на таких тварин як мавпи, зокрема ціномолгус або макака резус, або миші і щури.

Крім того, зв'язуючі компоненти молекули не обмежені або не визначені конкретним доменом або антигенною детермінантою антигену, який / яка є їх мішенню. Краще з позицій перехресної реактивності з однією або декількома молекулами антигенів з видів крім людини, яка (і) призначена (и) для застосування на тваринних моделях при розробці терапевтичного антагоніста Ang2/ VEGF, зв'язуючий компонент молекули розпізнає епітоп у області відповідного антигену, яка має високий ступінь ідентичності з людським антигеном. Наприклад, у разі мишачої моделі анти-Ang2 імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, включений у біспецифічні зв'язуючі молекули, пропонувані у винаході, розпізнає епітоп, який повністю або частково локалізовано у EGF-2-домені Ang2, для якого характерна висока ідентичність при порівнянні людської та мишачої послідовності.

Краще VEGF-зв'язуючий компонент зв'язується з ізоформами VEGF VEGF165 і/або VEGF121.

Іншим об'єктом винаходу є молекули нуклеїнових кислот, які кодують біспецифічні зв'язуючі молекули, пропонувані у винаході. Зазначені молекули нуклеїнових кислот у контексті даного опису позначають також як «нуклеїнові кислоти, пропонувані у винаході», і вони можуть мати також форму генетичної конструкції, зазначеної у цьому описі. Нуклеїнова кислота, пропонувана у винаході, може являти собою геномну ДНК, кДНК або синтетичну ДНК (таку як ДНК з кодонами, які найбільш часто зустрічаються, яка спеціально адаптована для експресії у вибраній клітині-хазяїні або організмі-хазяїні). Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу нуклеїнова кислота, пропонувана у винаході, перебуває у практично виділеній формі, як зазначено вище у даному описі.

Нуклеїнова кислота, пропонувана у винаході, може мати також форму вектора, може бути

присутньою у векторі і / або представляти собою частину вектора, такого, наприклад, як плазміда, косміда або YAC. Вектор може представляти собою насамперед експресійний вектор, тобто вектор, який може забезпечувати експресію біспецифічної молекули *in vitro* та / або *in vivo* (тобто у прийнятній / прийнятному клітині-хазяїні, організмі-хазяїні і / або експресійній системі).

Зазначений експресійний вектор, як правило, містить щонайменше одну нуклеїнову кислоту, пропонувану у винаході, яка функціонально пов'язана з одним або декількома прийнятними регуляторними елементами, такими як промотор (и), енхансер (и), термінатор (и) і т.п. . Зазначені елементи і їх відбір з позицій експресії конкретної послідовності у конкретному хазяїні знаходяться у компетенції фахівця у даній галузі. Конкретні приклади регуляторних елементів та інших елементів, придатних або необхідних для експресії біспецифічних зв'язуючих молекул, запропонованих у винаході, таких як промотори, енхансери, термінатори, фактори інтеграції, маркери для селекції, лідерні послідовності, репортерного гени і т.п., описані, наприклад, на сс.131-133 WO 2006/040153.

Нуклеїнові кислоти, пропонувані у винаході, можна створювати або отримувати добре відомим методом (наприклад, шляхом автоматичного синтезу ДНК та / або методом рекомбінантної ДНК) на основі інформації про амінокислотних послідовностях поліпептидів, запропонованих у винаході, яка представлена в даному описі, та / або їх можна виділяти з придатного джерела, яке зустрічається у природних умовах.

Наступним об'єктом винаходу є клітини-хазяїни, які експресують або у яких може відбуватися експресія однієї або декількох біспецифічних зв'язуючих молекул, запропонованих у винаході; та / або які містять нуклеїнову кислоту, пропонувану у винаході. у одному з конкретних кращих варіантів здійснення винаходу клітини-хазяїни являють собою бактеріальні клітини; іншими придатними клітинами є клітина дріжджів, клітини грибів або клітини ссавців.

Прийнятними бактеріальними клітинами є клітини грамнегативних штамів бактерій, таких як штами *Escherichia coli*, *Proteus* і *Pseudomonas*, і грампозитивних штамів бактерій, таких як штами *Bacillus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus* і *Lactococcus*. Прийнятними грибними клітинами є клітини видів *Trichoderma*, *Neurospora* і *Aspergillus*. Прийнятними клітинами дріжджів є клітини видів *Saccharomyces* (наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (наприклад, *Schizosaccharomyces pombe*), *Pichia* (наприклад, *Pichia pastoris* і *Pichia methanolica*) і *Hansenula*.

Прийнятними клітинами ссавців є, наприклад, CHO-клітини, BHK-клітини, HeLa-клітини, COS-клітини і т.п. Однак можна використовувати також клітини амфібій, клітини комах, клітини рослин і будь-які інші клітини, які застосовують у цій галузі для експресії гетерологічних білків.

Винахід належить і до способів отримання біспецифічної зв'язуючої молекули, запропонованої у винаході, як правило, що полягає у тому, що здійснюють стадії, на яких:

- культивують клітини-хазяїни, які містять нуклеїнову кислоту, що має здатність кодувати біспецифічну зв'язуючу молекулу у умовах, які забезпечують експресію біспецифічної зв'язуючої молекули, запропонованої у винаході; і

- вивільняють або виділяють з культури поліпептид, який експресується клітинами-хазяїнами; і

- необов'язково додатково очищають і / або модифікують, та / або включають у препаративну форму біспецифічну зв'язуючу молекулу, пропонувану у винаході.

Для виробництва у промисловому масштабі кращими організмами-хазяїнами є штами *E. coli*, *Pichia pastoris* і *S. cerevisiae*, які придатні для великомасштабної експресії, виробництва та ферментації, і насамперед для великомасштабної експресії, виробництва та ферментації фармацевтичних продуктів.

Вибір конкретної експресійної системи залежить, зокрема, від вимог до певних пост-трансляційних модифікацій, більш конкретно до глікозилювання. Для отримання біспецифічної зв'язуючої молекули, запропонованої у винаході, для якої глікозилювання є бажаним чи необхідним, потрібно застосовувати для експресії клітини-хазяїни ссавців, що мають здатність глікозилювати білок, який експресується. У цьому плані фахівцеві у даній галузі має бути очевидно, що отримана схема глікозилювання (тобто вид, кількість і положення приєднаних залишків) повинна залежати від клітини або клітинної лінії, яка застосовується для експресії.

Біспецифічні зв'язуючі молекули, пропонувані у винаході, можна отримувати або у клітині, відповідно до описаного вище методу, внутрішньоклітинно (наприклад, у цитозолі, періплазмі або у тільцях включення), а потім виділяти з клітин-хазяїв і необов'язково додатково очищати; або їх можна отримувати позаклітинно (наприклад, у середовищі, у якій культивують клітини-хазяїни), а потім виділяти з культурального середовища і необов'язково додатково очищати.

Методи і реагенти, які застосовують для отримання поліпептидів за допомогою рекомбінантної ДНК, такі як специфічні прийнятні експресійні вектори, методи трансформації або трансфекції, маркери для селекції, методи індукції експресії білків, умови культивування і

т.п., відомі у даній галузі. Аналогічно цьому методики виділення і очищення білків, застосовувані у методі виробництва поліпептиду, пропонованого у винаході, добре відомі фахівцю у даній галузі.

Наступним об'єктом винаходу є пептид, який має амінокислотну послідовність CDR3, що входить у конструкцію анти-VEGF-VHH, яка має амінокислотну послідовність, вибрану з амінокислотних послідовностей, які представлені у SEQ ID NO: 9-57 і чи SEQ ID NO: 58-127 відповідно, і молекула нуклеїнової кислоти, яка його кодує.

Ці пептиди відповідають CDR3, виведеним з VHH, запропонованих у винаході. Їх, зокрема, молекули нуклеїнових кислот, які кодують їх, можна застосовувати для трансплантації CDR для того, щоб замінювати CDR3 у ланцюзі імуноглобуліну або для інсерції у неімуноглобуліновий каркас, наприклад, інгібітор протеази, ДНК-зв'язуючий білок, цитохром b562, що складається з пучка спіралей білок, пов'язаний дисульфідним містком пептид, ліпокаїн або антикалін, які надають вказаному каркасу здатність зв'язуватися з мішенню. Метод трансплантації CDR добре відомий у даній галузі і його широко застосовували, наприклад, для гуманізації антитіл (які, як правило, містять CDR з антитіла гризунів, трансплантовані у каркасні ділянки Fv людського антитіла).

Для отримання імуноглобулінового або неімуноглобулінового каркаса, що містить CDR3, пропонований у винаході, ДНК, яка кодує зазначену молекулу, можна отримувати за допомогою стандартних методів молекулярної біології, наприклад, за допомогою синтезу генів, «відпалу» олігонуклеотидів або на основі перекриваються ПЛР-фрагментів, які описані, наприклад, у Daugherty та ін., *Nucleic Acids Research*, т. 19, 9, 1991, сс. 2471-2476. Метод інсерції CDR3 VHH у неімуноглобуліновому каркас описаний у Nicaise та ін., *Protein Science*, 13, 2004, сс. 1882-1891.

Винахід належить і до продукту або композиції, що містить / містить щонайменше одну біспецифічну зв'язуючу молекулу, проповану у винаході, і необов'язково один або кілька добре відомих додаткових компонентів зазначених композицій, тобто які залежать від передбачуваного застосування композиції.

Для фармацевтичного застосування на основі біспецифічної зв'язуючої молекули, запропонованої у винаході, або поліпептиду, який її містить, можна приготувати форми у вигляді фармацевтичного препарату або композиції, що містить / містить щонайменше одну біспецифічну зв'язуючу молекулу, проповану у винаході, і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій, розчинник або ексципієнт та / або ад'ювант і необов'язково один або кілька додаткових фармацевтично активних поліпептидів і / або сполук. Прикладами таких препаративних форм є (але, не обмежуючись лише ними) форми, придатні для орального введення, для парентерального введення (наприклад, за допомогою внутрішньовенної, внутрішньом'язової або підшкірної ін'єкції або внутрішньовенної інфузії), для місцевого застосування, для застосування шляхом інгаляції, за допомогою шкірного пластиру, за допомогою імплантату, супозиторія і т.д. Зазначені прийнятні для введення форми, які можуть бути твердими, напівтвердими або рідкими залежно від шляху введення, а також методи і носії для їх застосування у препаратах, повинні бути очевидні фахівцеві у даній галузі і додатково представлені у даному описі.

Таким чином, наступним об'єктом винаходу є фармацевтична композиція, яка містить щонайменше одну біспецифічну зв'язуючу молекулу, зокрема один імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, пропонований у винаході, або поліпептид, який його містить, і щонайменше один прийнятний носій, розріджувач або ексципієнт (тобто придатний для фармацевтичного застосування) і необов'язково одну або декілька додаткових активних субстанцій.

Біспецифічні зв'язуючі молекули, пропоновані у винаході, можна включати у препаративну форму і вводити за допомогою будь-якого придатного добре відомого методу: див посилання, які стосуються передусім імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів, наприклад, у WO 2004/041862, WO 2004/041863, WO 2-04/041865, WO 2004/041867 у WO 2008/020079, а також у стандартних довідниках, таких як Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е вид., вид-во Mack Publishing Company, США, 1990, Remington, the Science and Practice of Pharmacy, 21-е вид., вид-во Lippincott Williams і Wilkins, 2005 або Handbook of Therapeutic Antibodies, під ред. S. Dubel, вид-во Wiley, Weinheim, 2007 (див., наприклад, сс. 252-255).

Наприклад, імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, пропонований у винаході, можна включати у препаративну форму і вводити будь-яким методом, широко застосовуваним для канонічних антитіл і фрагментів антитіл (включаючи ScFv і димерні антитіла) та інших фармацевтично активних білків. Зазначені препаративні форми і методи їх отримання повинні бути очевидні фахівцеві у даній галузі і, наприклад, включають препарати, придатні для

парентерального введення (наприклад, внутрішньовенного, внутрішньочеревного, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньопросвітного, внутрішньоартеріального або внутрішньооболонкового введення) або для місцевого (тобто трансдермального або внутрішньодермального) застосування.

5 Препарати для парентерального введення можуть являти собою, наприклад, стерильні розчини, суспензії, дисперсії або емульсії, які можна застосовувати для інфузії або ін'єкції. Прийнятними носіями чи розчинниками для таких препаратів є, наприклад (але не обмежуючись лише ними) стерильна вода і фармацевтично прийнятні водні буфери і розчини, такі як забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Рінгера, розчин декстрази, розчин Хенкса; водні розчини олій; гліцерин; етанол; гліколі, такі як пропіленгліколь, або також мінеральні олії, тваринні олії і рослинні олії, наприклад, арахісова олія, соєва олія, а також їх прийнятні суміші. Як правило, кращими є водні розчини або суспензії.

10 Так, біспецифічну зв'язуючу молекулу, пропоновану у винаході, можна вводити системно, наприклад, орально, у поєднанні з фармацевтично прийнятним наповнювачем, таким як інертний розріджувач або засвоюваний їстівний носій. Для орального терапевтичного застосування біспецифічну зв'язуючу молекулу, пропоновану у винаході, можна об'єднувати з одним або декількома ексципієнтами і застосовувати у формі призначених для прийому всередину таблеток, трансбуккальних таблеток, пастилок, капсул, еліксирів, суспензій, сиропів, облаток і т.п. Зазначені композиції і препарати повинні містити Dll4 зв'язуючу молекулу, пропоновану у винаході, у кількості, що становить щонайменше 0,1%. Зазначене процентний вміст у композиціях і препаратах може, природно, варіюватися і може, як правило, становити від приблизно 2 до приблизно 60% у перерахунку на масу зазначену стандартної дози лікарського засобу. Кількість біспецифічної зв'язуючої молекули, запропонованої у винаході, у призначених для терапевтичного застосування композиціях є таким, щоб отримувати ефективний рівень доз.

20 Таблетки, пігулки, капсули і т.п. можуть містити також пов'язуючі агенти, ексципієнти, розпушувачі, замаслювачі і підсолоджуючі речовини або коригенти, наприклад, згадані на сс. 143-144 WO 2008/020079. Коли стандартна доза лікарського засобу являє собою капсулу, то вона може містити крім продуктів зазначеного вище типу рідкий носій, такий як рослинна олія або поліетиленгліколь. Різні інші матеріали можуть бути присутніми у вигляді покриттів або їх можна застосовувати для іншої модифікації фізичної форми твердої стандартної дози лікарського засобу. Наприклад, на таблетки, пігулки та капсули можна наносити покриття з желатину, воску, шелаку або цукру і т.п. Сироп або еліксир може включати біспецифічні зв'язуючі молекули, пропоновані у винаході, сахарозу або фруктозу у якості підсолоджуючої речовини, метил- і пропілпарабен у якості консервантів, барвник і коригенти, такий як вишнева або апельсинова віддушка. Звичайно, будь-який продукт, застосовуваний для приготування будь-якої стандартної дози лікарського засобу, повинен бути фармацевтично прийнятним і практично нетоксичним у застосовуваних кількостях. Крім того, біспецифічні зв'язуючі молекули, пропоновані у винаході, можна включати у препарати або пристрої з уповільненим вивільненням.

30 Препарати та форми для орального введення можуть мати також ентросолюбільне покриття, яке дозволяє конструкціям, пропонованим у винаході, зберігатися у середовищі шлунка і проходити у кишечник. Більш конкретно препарати і форми для орального введення можна готувати у вигляді, який дозволяє здійснювати введення у необхідний відділ шлунково-кишкового тракту. Крім того, для введення у шлунково-кишковий тракт можна застосовувати супозиторії.

40 Біспецифічні зв'язуючі молекули, пропоновані у винаході, можна вводити також внутрішньо або внутрішньочеревно за допомогою інфузії або ін'єкції, що більш докладно описано на сс. 144 і 145 WO 2008/020079.

50 У разі призначених для місцевого застосування біспецифічних зв'язуючих молекул, запропонованим у винаході, їх потрібно наносити на шкіру у вигляді композицій або форм у поєднанні з прийнятним для дерматологічного застосування носієм, який може бути твердим або рідким, що більш докладно описано на с. 145 WO 2008/020079.

60 Як правило, концентрація біспецифічних зв'язуючих молекул, запропонованим у винаході, у рідкій композиції, такий як лосьйон, повинна складати приблизно 0,1-25 мас.%, краще приблизно 0,5-10 мас.%. Концентрація у напівтвердій або твердій композиції, такий як гель або порошок, повинна складати приблизно 0,1-5 мас.%, краще приблизно 0,5-2,5 мас.%.
55

Кількість біспецифічних зв'язуючих молекул, запропонованим у винаході, яка потрібна для лікування, має варіюватися не тільки залежно від конкретної вибраної біспецифічної зв'язуючої молекули, але також від шляху введення, природи стану, що підлягає лікуванню, і віку та стану пацієнта, і, врешті-решт, вона визначається приписом лікаря або клініциста. Крім того, доза

біспецифічних зв'язуючих молекул, запропонованих у винаході, варіює залежно від клітини-, пухлини-, тканини-, трансплантата-або органа-мішені.

Необхідну дозу, як правило, можна застосовувати у вигляді одноразової дози або у вигляді розділених доз, які призначені для введення з відповідними інтервалами, наприклад, у вигляді двох, трьох, чотирьох або більшої кількості субдоз у день. Режим введення самих субдоз можна додатково розділяти, наприклад, на ряд введень, розділених «порожніми» проміжками без обробки; наприклад, на кілька інгаляцій з використанням інсуфлятора, або шляхом внесення декількох крапель у око.

Схема введення може включати пролонговану щоденну обробку. Під «пролонгованою» мають на увазі обробку протягом періоду часу, що складає щонайменше два тижні і краще кілька тижнів, місяців або років. Необхідність змін у цій схемі прийому доз може визначати звичайний фахівець у даній галузі за допомогою загальноприйнятих експериментів, зазначених у цьому описі (див., Remington's Pharmaceutical Sciences, під ред. Martin EW, 4-е вид., вид-во Mack Publishing Co., Easton, PA). Дозу може регулювати також кожен лікуючий лікар у разі будь-яких ускладнень.

Ще одним варіантом здійснення винаходу є застосування біспецифічних зв'язуючих молекул, наприклад, імуноглобулінових одиничних варіабельних доменів або містять поліпептидів, для наступних терапевтичних цілей:

- для попередження, лікування та / або полегшення порушення, захворювання чи стану, насамперед у людини, яке асоційоване з опосередковуваними VEGF та / або пов'язаними з Ang2 впливами на ангиогенез, або яке можна попереджати, лікувати або полегшувати допомогою модуляції шляхи передачі сигналів Notch і / або передачі сигналів Tie2 за допомогою біспецифічної зв'язуючої молекули, запропонованої у винаході,

- у способі лікування пацієнта, який потребує такої терапії, що полягає у тому, що вводять індивідууму, який потребує цього, у фармацевтично активній кількості щонайменше одну біспецифічну зв'язуючу молекулу, пропоновану у винаході, наприклад імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, або що містить їх фармацевтичну композицію;

- для приготування лікарського засобу, призначеного для попередження, лікування або полегшення порушень, захворювань або станів, асоційованих з опосередковуваними VEGF та / або опосередковуваними Ang2 впливами на ангиогенез;

- у якості діючої речовини у фармацевтичній композиції або лікарському засобі, застосовуваній / вживаному для зазначених вище цілей.

Згідно конкретного об'єкта винаходу порушення, захворювання або стан являє собою рак або злоякісне захворювання, зазначена у цьому описі.

Згідно іншому об'єкту винаходу захворювання являє собою очну хворобу, асоційовану з опосередковуваними VEGF та / або опосередковуваними Ang2 впливами на ангиогенез, або яку можна лікувати або полегшувати допомогою модуляції шляху передачі сигналів Notch і / або передачі сигналів Tie2 за допомогою біспецифічної зв'язуючої молекули.

Залежно від що підлягає лікуванню злоякісного захворювання біспецифічну зв'язуючу молекулу можна застосовувати індивідуально або у поєднанні з одним або декількома додатковими терапевтичними засобами, зокрема, вибраними з хіміотерапевтичних засобів типу пошкоджуючих ДНК агентів або терапевтично активних сполук, які інгібують ангиогенез, шляхи трансдукції сигналів або точки контролю мітозу у ракових клітинах.

Додаткові терапевтичні засоби можна вводити одночасно, необов'язково у вигляді компонента одного і того ж фармацевтичного препарату, або до, або після введення біспецифічної зв'язуючої молекули.

У конкретних варіантах здійснення винаходу додатковий терапевтичний засіб може являти собою (але, не обмежуючись лише ними) один або кілька інгібіторів, вибраних з групи інгібіторів EGFR, VEGFR, HER2-neu, Her3, AuroraA, AuroraB, PLK і PI3-кінази, FGFR, PDGFR, Raf, Ras, KSP, PDK1, PTK2, IGF R або IR.

Іншими прикладами додаткових терапевтичних агентів є інгібітори CDK, Akt, src / bcr abl, cKit, cMet / HGF, c-Myc, Flt3, HSP90, антагоністи hedgehog, інгібітори JAK / STAT, Mek, mTor, NFκappaB, протеосом, Rho, інгібітор шляху передачі сигналів wnt або інгібітор шляху убіквітінзації або інший інгібітор шляху передачі сигналів Notch.

Прикладами інгібіторів кінази Aurora є (але, не обмежуючись тільки ними) PHA-739358, AZD-1152, AT 9283, CYC-116, R-763, VX-680, VX-667, MLN-8045, PF-3814735.

Прикладом інгібітора PLK є GSK-461364.

Прикладами інгібіторів raf є BAY-73-4506 (який є також інгібітором VEGFR), PLX 4032, RAF 265 (який є також інгібітором VEGFR), сорафеніб (який є також інгібітором VEGFR) і XL 281.

Прикладами інгібіторів KSP є іспінесіб, ARRY-520, AZD-4877, CK 1122697, GSK 246053A,

GSK-923295, MK-0731 і SB-743921.

Прикладами інгібіторів src і / або bcr-abl є дасатиніб, AZD-0530, босутиніб, XL 228 (який є також інгібітором IGF-1R), нілотиніб (який є також інгібітором PDGFR і cKit), іматиніб (який є також інгібітором cKit) і NS-187.

5 Прикладом інгібітора PDK1 є BX-517.

Прикладом інгібітора Rho є BA-210.

Прикладами інгібіторів PI3-кінази є PX-866, BEZ-235 (який є також інгібітором mTor), XL 418 (який є також інгібітором Akt), XL-147 і XL 765 (який є також інгібітором mTor).

10 Прикладами інгібіторів cMet або HGF є XL-184 (який є також інгібітором VEGFR, cKit, Flt3), PF-2341066, MK-2461, XL-880 (який є також інгібітором VEGFR), MGCD-265 (який є також інгібітором VEGFR, Ron, Tie2), SU-11274, PHA-665752, AMG-102 і AV-299.

Прикладом інгібітора c-Мус є CX-3543.

15 Прикладами інгібіторів Flt3 є AC-220 (який є також інгібітором cKit and PDGFR), KW 2449, лестауртиніб (який є також інгібітором VEGFR, PDGFR, PKC), TG-101348 (який є також інгібітором JAK2), XL-999 (який є також інгібітором cKit, FGFR, PDGFR і VEGFR), сунітиніб (який є також інгібітором PDGFR, VEGFR і cKit) і тандутиніб (який є також інгібітором PDGFR і cKit).

Прикладами інгібіторів HSP90 є танеспіміцин, алвеспіміцин IPI-504 і CNF 2024.

Прикладами інгібіторів JAK / STAT є CYT-997 (який взаємодіє також з тубуліном), TG 101 348 (який є також інгібітором Flt3) і XL-019.

20 Прикладами інгібіторів Mek є ARRY-142886, PD-325901, AZD-8330 і XL 518.

Прикладами інгібіторів mTor є темсіролімус, AP-23573 (який діє також як інгібітор VEGF), еверолімус (крім того, є інгібітором VEGF), XL-765 (який є також інгібітором PI3-кінази) і BEZ-235 (який є також інгібітором PI3 -кінази).

Прикладами інгібіторів Akt є перифосін, GSK-690693, RX-0201 і тріцірібін.

25 Прикладами інгібіторів cKit є AB-1010, OSI-930 (який діє також у якості інгібітора VEGFR), AC-220 (який є також інгібітором Flt3 і PDGFR), тандутиніб (який є також інгібітором Flt3 і PDGFR), аксітиніб (який є також інгібітором VEGFR і PDGFR), XL-999 (який є також інгібітором Flt3, PDGFR, VEGFR, FGFR), сунітиніб (який є також інгібітором Flt3, PDGFR, VEGFR) і XL-820 (який діє також як інгібітор VEGFR і PDGFR), іміаніб (який є також інгібітором bcr-abl), нілотиніб (який є також інгібітором bcr-abl і PDGFR).

30 Прикладами антагоністів hedgehog є IPI-609 і CUR-61414.

Прикладами інгібіторів CDK є селіцикліб, AT-7519, P-276, ZK-CDK (який є також інгібітором VEGFR2 і PDGFR), PD-332991, R-547, SNS-032, PHA-690509 і AG 024322.

35 Прикладами інгібіторів протеосоми є бортезоміб, карфілзоміб і NPI-0052 (який є також інгібітором NFκappaB).

Прикладом інгібітора NFκappaB-шляху є NPI-0052.

Прикладом інгібітора шляху убіквітінзації є HBX-41108.У кращих варіантах здійснення винаходу додатковий терапевтичний засіб являє собою антиангіогенний агент.

40 Прикладами антиангіогенних агентів є інгібітори FGFR, PDGFR і VEGFR або відповідні ліганди (наприклад, інгібітори VEGF типу пегаптаніба або антитіло до VEGF бевасізумаб) і талідомід, вказані агенти вибрані з групи, що включає (але, не обмежуючись лише ними) бевасізумаб, мотесаніб, CDP-791, SU 14813, телатиніб, KRN-951, ZK-CDK (який є також інгібітором CDK), ABT-869, BMS-690514, RAF-265, IMC-KDR, IMC-18F1, IMiD (імуномодуляторні лікарські засоби), похідне талідоміду CC-4047, леналідомід, ENMD 0995, IMC-D11, Ki 23057, бріваніб, цедіраніб, XL-999 (який є також інгібітором cKit і Flt3), 1B3, CP 868596, IMC 3G3, R-1530 (який є також інгібітором Flt3), сунітиніб (який є також інгібітором cKit і Flt3), аксітиніб (який є також інгібітором cKit), лестауртиніб (який є також інгібітором Flt3 і PKC), ваталаніб, тандутиніб (який є також інгібітором Flt3 і cKit), пазопаніб, GW 786034, PF-337210, IMC-1121B, AVE-0005, AG-13736, E-7080, CHIR 258, сорафеніб тозилат (який є також інгібітором Raf) , RAF-265 (який є також інгібітором Raf), вантетаніб, CP-547632, OSI-930, AEE-788 (EGFR і Her2), BAY-57-9352 (який є також інгібітором Raf), BAY-73-4506 (який також є інгібітором Raf), XL 880 (який є також інгібітором cMet), XL 647 (який є також інгібітором EGFR і EphB4), XL 820 (який є також інгібітором cKit) і нілотиніб (який є також інгібітором cKit і bcr-abl).

55 Додатковий терапевтичний засіб можна вибирати також з інгібіторів EGFR, воно може являти собою низькомолекулярний інгібітор EGFR або антитіло до EGFR. Прикладами антитіл до EGFR є (але, не обмежуючись лише ними) цетуксимаб, панітумумаб, матузумаб; прикладом низькомолекулярного інгібітора EGFR є гефітиніб. Іншим прикладом модулятора EGFR є кон'югат EGF з токсином.

60 З інгібіторів EGFR і Her2, які можна застосовувати у поєднанні з біспецифічною зв'язуючою молекулою, запропонованою у винаході, слід згадати лапатиніб, гефітиніб, ерлотиніб,

цетуксимаб, трастузумаб, німотузумаб, залутумумаб, вандетаніб (який є також інгібітором VEGFR), пертузумаб, XL 647, HKI-272, BMS-599626 ARRY-334543, AV 412, mAB-806, BMS-690514, JNJ 26483327, AEE-788 (який є також інгібітором VEGFR), ARRY-333786, IMC-11F8, Zemab.

Іншими агентами, які доцільно застосовувати для лікування у поєднанні з біспецифічною зв'язуючою молекулою, запропонованою у винаході, є тосітумумаб і ібрітумомаба тіуксетан (два мічених за допомогою радіоактивних ізотопів антитіла до CD20), алемтузумаб (антитіло до CD52), деносумаб (інгібітор ліганда фактора диференціювання остеокластів), галіксимаб (антагоніст CD80), офатумумаб (інгібітор CD20), занолімуаb (антагоніст CD4), SGN40 (модулятор ліганда рецептора CD40), ритуксимаб (інгібітор CD20) або мапатумумаб (агоніст рецептора TRAIL-1), REGN421(SAR153192) або OMP-21M18 (інгібітори DII4).

Іншими хіміотерапевтичними лікарськими засобами, які можна застосовувати у поєднанні з біспецифічними зв'язуючими молекулами, пропонованими у даному винаході, є (але, не обмежуючись лише ними) гормони, аналоги гормонів і антигормональні засоби (наприклад, тамоксифен, тореміфен, ралоксифен, фулвестрант, мегестрола ацетат, флутамід, нілутамід, бікалутамід, ципротерону ацетат, фінастерід, бусереліна ацетат, флудокортизон, флуоксиместерон, медроксипрогестерон, остроотід, арзоксифен, пасіреотід, вапреотід), інгібітори ароматази (наприклад, анастрозол, летрозол, ліарозол, ексеместан, атаместан, форместан), агоністи і антагоністи LHRH (наприклад, гoserelin ацетат, леупролід, абарелікс, цетрорелікс, деслорелін, гістрелін, трипторелін), антиметаболіти (наприклад, антифолатів типу метотрексату, пеметрекседу, аналоги піримідину типу 5 фторурацилу, капецитабіну, децитабіна, неларабіна і гемцитабіну, аналоги пурину і аденозину, такі як меркаптопурина тіогуанін, кладрибін і пентостатином, цитарабін, флударабін); протипухлинні антибіотики (наприклад, антрацикліни, такі як доксорубіцин, даунорубіцин, епірубіцин та ідарубіцин, мітоміцин-С, блеоміцин, дактиноміцин, плікаміцин, мітоксантрон, піксантрон, стрептозоцином); похідні платини (наприклад, цисплатин, оксаліплатин, карбоплатин, лобоплатин, сатраплатин); алкілюючі засоби (наприклад, естрамустин, меклоретамін, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, дакарбазін, циклофосфамід, іфосфамід, гідроксисечовина, темозоломід, нітрозосечовини, такі як кармустин і ломустин, тіотепа); антимітотичні засоби (наприклад, алкалоїди барвінку типу вінбластину, віндесіна, вінорельбіну, вінфлуїна і вінкрістину; і таксани, такі як паклітаксел, доцетаксел та їх препаративні форми, ларотаксел; сімотаксел і епотілоні типу іксабепілона, патупілона, ZK-EPO); інгібітори топоізомерази (наприклад, епіподофіллотоксини, такі як етопосид і етопосфос, теніпосид, амсакрин, топотекан, іринотекан) і хіміотерапевтичні агенти змішаного типу, такі як аміфостин, анагрелід, інтерферон альфа, прокарбазин, мітотан і порфімер, бексаротен, целекоксиб.

Ефективність біспецифічних зв'язуючих молекул, запропонованих у винаході, або які містять їх поліпептидів або які містять їх композицій можна оцінювати за допомогою прийнятного аналізу *in vitro*, клітинного аналізу, аналізу *in vivo* та / або на добре відомих тварин моделях, або за допомогою будь-якої їх комбінації залежно від специфічного представляє інтерес захворювання або порушення. Прийнятні аналізи і тварини моделі очевидні фахівцям у даній галузі, і вони представляють собою аналізи, представлені у даному описі, і вживані нижче у прикладах, наприклад, аналіз проліферації.

Дані, отримані у експериментах, проведених при створенні винаходу, підтверджують, що біспецифічні зв'язуючі молекули, пропоновані у винаході, мають властивості, які перевищують властивості зв'язуючих молекул, відомих з існуючого рівня техніки. Однією із зазначених властивостей є повне інгібування взаємодії VEGF165-VEGFR2 і низьке значення IC₅₀, яке можна розраховувати, наприклад, на основі отриманих за допомогою ELISA даних, представлених на фіг. 1 і у таблиці 5, а також значення IC₅₀ (нМ) для VHN за даними AlphaScreen-аналізу, які представлені на фіг. 3, 17, 18 і у таблиці 7; і дані про рівень афінності K_D (нМ) очищених VHN до рекомбінантного людського VEGF і мишачого VEGF, які представлені у таблиці 9, 10 і на фіг. 5. Крім того, що видно з таблиці 13, зв'язуючі VEGF агенти, пропоновані у винаході, мають високу ефективність, тобто при застосуванні у концентраціях, що знаходяться у субнанолярному діапазоні, при оцінці проліферації клітин лінії HUVEC. Ці дані свідчать про те, що біспецифічні зв'язуючі молекули, пропоновані у винаході, є перспективними кандидатами, які можуть мати терапевтичну ефективність щодо захворювань і порушень, асоційованих з опосередковуваними VEGF-впливами на ангиогенез, таких як рак.

Іншим варіантом здійснення винаходу є спосіб діагностування захворювання, що полягає у тому, що

- а) приводять у контакт зразок зі зв'язуючою молекулою, запропонованою у винаході, і
- б) визначають зв'язування зазначеної зв'язуючої молекули з зразком і

в) порівнюють зв'язування, виявлене на стадії (б), зі стандартом, при цьому різниця у зв'язуванні з вказаним зразком є діагностичним щодо захворювання або порушення, асоційованого з опосередковуваними VEGF-та / або Ang2 впливами на ангіогенез.

Для такого та інших варіантів застосування може виявитися доцільним додатково модифікувати біспецифічну зв'язуючу молекулу, пропоновану у винаході, наприклад, шляхом інтродукції функціональної групи, яка представляє собою один компонент специфічної такої, що зв'язується пари, такий як зв'язуються пара біотин-(степто) авідин. Вказану функціональну групу можна застосовувати для з'єднання біспецифічної зв'язуючої молекули, запропонованої у винаході, з іншим білком, поліпептидом або хімічною сполукою, який / яка пов'язаний / пов'язано з іншою половиною що зв'язується пари, тобто допомогою формування що зв'язується пари. Наприклад, біспецифічну зв'язуючу молекулу, пропоновану у винаході, можна кон'югованих з біотином і пов'язувати з іншим білком, поліпептидом, з'єднанням або носієм, який кон'югованих з авідином або стрептавідином. Наприклад, зазначену кон'юговану біспецифічну зв'язуючу молекулу, пропоновану у винаході, можна застосовувати у якості репортера, наприклад, у діагностичній системі, у якій виявляється утворюваний сигнал агент кон'югований з авідином або стрептавідином.

Короткий опис креслень

На кресленнях показано:

на фіг. 1 – результати, що демонструють, що очищені одновалентні VHH блокують взаємодію hVEGF165/hVEGFR2-Fc (ELISA);

на фіг. 2 – результати, що демонструють, що очищені одновалентні VHH блокують взаємодію hVEGF165/hVEGFR1-Fc (ELISA);

на фіг. 3 – результати, що демонструють, що очищені одновалентні VHH блокують взаємодію hVEGF165/hVEGFR2-Fc (AlphaScreen);

на фіг. 4 – результати, що демонструють, що очищені одновалентні VHH блокують взаємодію hVEGF165/hVEGFR1-Fc (AlphaScreen);

на фіг. 5 – результати, що демонструють зв'язування одновалентних VHH з рекомбінантним людським і мишачим VEGF (ELISA);

на фіг. 6 – результати, що демонструють зв'язування одновалентних VHH з людським VEGF121;

на фіг. 7 – результати демонструють, що очищені VHH пов'язуються з VEGFB, VEGFC, VEGFD і PIGF;

на фіг. 8 – результати демонструють, що форматовані VHH блокують взаємодію hVEGF165/hVEGFR2-Fc (ELISA);

на фіг. 9 – результати демонструють, що форматовані VHH блокують взаємодію hVEGF165/hVEGFR1-Fc (ELISA);

на фіг. 10 – результати демонструють, що форматовані VHH блокують взаємодію hVEGF165/hVEGFR2-Fc (AlphaScreen);

на фіг. 11 – результати, що демонструють, що форматовані VHH блокують взаємодію hVEGF165/hVEGFR1-Fc (AlphaScreen);

на фіг. 12 – результати, що демонструють, що форматовані VHH блокують взаємодію mVEGF164/mVEGFR2-Fc (AlphaScreen);

на фіг. 13 – результати, що демонструють, що форматовані VHH зв'язуються з мишачим і людським VEGF;

на фіг. 14 – результати, що демонструють, що форматовані VHH не зв'язуються з VEGFB, VEGFC, VEGFD і PIGF;

на фіг. 15 – результати, що демонструють, що форматовані VHH зв'язуються з VEGF121;

на фіг. 16 – порівняльний аналіз послідовності VHH VEGFBII23B04 і людської консенсусної послідовності зародкової лінії VH3/JH;

на фіг. 17 – результати, що демонструють, що варіанти VHH VEGFBII23B04 блокують взаємодію hVEGF165/hVEGFR2-Fc (AlphaScreen);

на фіг. 18 – результати, що демонструють, що клони VEGFBII23B04 з оптимізованою послідовністю блокують взаємодію hVEGF165/hVEGFR2-Fc (AlphaScreen);

на фіг. 19 – порівняльний аналіз послідовності VHH VEGFBII5B05 і людської консенсусної послідовності зародкової лінії VH3/JH;

на фіг. 20 – опис двовалентних VHH к Ang2;

на фіг. 21 – результати, що демонструють, що очищені двовалентні VHH до Ang2 блокують взаємодію hAng2-hTie2 (25-1), mAng2-mTie2 (25-2) і cAng2-cTie2 (25-3) (ELISA);

на фіг. 22 – результати, що демонструють, що очищені двовалентні VHH до Ang2 блокують взаємодію hAng1-hTie2 (ELISA);

на фіг. 23 – опис тривалентних біспецифічних VHH VEGFxAng2;

на фіг. 24 - результати, що демонструють, що очищені тривалентні нанотіла VEGFxAng2 блокують взаємодію hVEGF-hVEGFR2 (AlphaScreen);

на фіг. 26 - результати, що демонструють, що очищені тривалентні VHH VEGFxAng2 блокують взаємодію hAng2-hTie2 (ELISA);

на фіг. 26 – опис тривалентних і чотирихвалентних біспецифічних VHH VEGFxAng2;

на фіг. 27 - результати, що демонструють, що очищені тривалентні і чотиривалентні VHH VEGFxAng2 блокують взаємодію hVEGF-hVEGFR2 (31-1) і hVEGF-hVEGFR1 (31-2) (AlphaScreen);

на фіг. 28 - результати, що демонструють, що очищені тривалентні і чотиривалентні VHH VEGFxAng2 блокують взаємодію hAng2-hTie2 (32-1), mAng2-mTie2 (32-2) і cAng2-cTie2 (32-3) (ELISA);

на фіг. 29 - результати, що демонструють, що очищені тривалентні і чотиривалентні VHH VEGFxAng2 блокують опосередковане hAng2 виживання клітин HUVEC;

на фіг. 30 - опис біспецифічних VHH VEGFxAng2 з оптимізованою послідовністю і афінністю;

на фіг. 31 - результати, що демонструють, що очищені VHH VEGFANGBII00022-25-28 VEGFxAng2 блокують взаємодію hVEGF-hVEGFR2 (35-1) і hVEGF-hVEGFR1 (35-2) (AlphaScreen);

на фіг. 32 - результати, що демонструють, що очищені VHH VEGFANGBII00022-25-28 VEGFxAng2 зв'язуються з людським VEGF165 (36-1) і hVEGF121 (36-2) (ELISA);

на фіг. 33 - результати, що демонструють, що очищені VHH VEGFANGBII00022-25-28 VEGFxAng2 зв'язуються з (А) мишачим і (Б) щурячим VEGF164 (ELISA);

на фіг. 34 - результати, що демонструють, що очищені VHH VEGFANGBII00022-25-28 VEGFxAng2 зв'язуються з (А) людським VEGF-B, (Б) людським VEGF-C, (В) людським VEGF-D і (Г) людським PlGF (ELISA);

на фіг. 35 - результати, що демонструють, що очищені VHH VEGFANGBII00022-25-28 VEGFxAng2 блокують взаємодію hAng2-hTie2 (39-1), mAng2-mTie2 (39-2) і cAng2-cTie2 (39-3) (ELISA);

на фіг. 36 - результати, що демонструють, що очищені VHH VEGFANGBII00022-25-28 VEGFxAng2 блокують взаємодію hAng1-hTie2 (ELISA);

на фіг. 37 - результати, що демонструють, що очищені VHH VEGFANGBII00022-25-28 VEGFxAng2 блокують опосередковане hAng2 виживання клітин HUVEC.

Матеріали і методи:

а) Отримання VEGF109 і оцінка його функціональної активності

кДНК, що кодує зв'язуючий рецептор домен ізоформи людського судинного ендотеліального фактора росту VEGF165 (GenBank: AAM03108.1; АК-залишки 27-135), клонували у векторі pET28a (фірма Novagen, Медісон, шт. Вісконсін) і надкспресували у *E.coli* (BL21 Star DE3) у вигляді міченого за допомогою His нерозчинного білка. Експресію індукували шляхом додавання 1мМ ізопропілтіогалактозиду (ІПТГ) і давали здійснюватися протягом 4 год при 37 ° С. Клітини збирали центрифугуванням і лізували шляхом опромінення клітинного дебриса ультразвуком. Тільки включення виділяли центрифугуванням. Після стадії відмивання за допомогою 1% Тритон X 100 (фірма Sigma-Aldrich) білки солюбілізували за допомогою 7,5 М гідрохлориду гуанідину і здійснювали повторну укладку (рефолдинг) шляхом послідовних циклів діалізу протягом ночі з використанням буферів з концентраціями сечовини, що знижуються з 6М до 0М. Повторно покладений білок очищали за допомогою іонообмінної хроматографії з використанням колонки MonoQ5/50GL (фірма Amersham BioSciences) і подальшої гель-фільтрації на колонці Супердекс75 10/300 GL (фірма Amersham BioSciences). Чистоту і гомогенність білка підтверджували методом ДСН-ПААГ і Вестерн-блотінгу. Крім того, оцінювали за допомогою ELISA активність щодо зв'язування з VEGFR1, VEGFR2 і бевацизумабом. Для цієї мети рекомбінантний людський VEGF109 (1 мкг / мл) імобілізували протягом ночі при 4 ° С у 96-лунковому планшеті MaxiSorp (фірма Nunc, Вісбаден, Німеччина). Лунки блокували розчином казеїну (1%). Додавали серійні розведення VEGFR1, VEGFR2 або бевацизумабу у сенсibilізований VEGF109 планшет і оцінювали зв'язування з використанням кон'югованого з лужною фосфатазою (AP) козячого антилюдського IgG, Fc-специфічного (фірма Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Вест-Гров, шт. Пенсільванія, США) і подальшої ферментативної реакції у присутності субстрату PNPP (пара-нітрофенілфосфат) (фірма Sigma-Aldrich). Встановлено, що VEGF109 може зв'язуватися з VEGFR1, VEGFR2 і бевацизумабом, що свідчить про активність отриманого VEGF109.

б) Кон'югація VEGF165 з KLH і оцінка функціональної активності VEGF165, кон'югованого з KLH

Рекомбінантний людський VEGF165 (фірма R & D Systems, Міннеаполіс, шт. Міннесота, США) кон'югували з гемоціаніном лімфи равлика, вирощеного у умовах марикультури (mCKLH), використовуючи набір Imject Immunogen EDC, що містить mCKLH (фірма Pierce, Рокфорд, шт. Іллінойс, США), згідно з інструкціями виробника. Ефективність кон'югації поліпептиду з mCKLH підтверджували за допомогою ДСН-ПААГ. Функціональну активність кон'югованого білка оцінювали за допомогою ELISA: для цієї мети кон'югований з KLH VEGF165 (2 мкг / мл) імобілізували протягом ночі при 4 ° С у 96-лунковому планшеті MaxiSorp (фірма Nunc, Вісбаден, Німеччина). Лунки блокували розчином казеїну (1%). Додавали серійні розведення VEGFR1 або VEGFR2 і оцінювали зв'язування з використанням кон'югованого з пероксидазою із хрому (HRP) козячого антилюдського IgG, Fc-специфічного (фірма Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Вест-Гров, шт. Пенсільванія, США) і подальшої ферментативної реакції у присутності субстрату TMB (3,3', 5,5'-тетраметілбензидін) (фірма Pierce, Рокфорд, шт. Іллінойс, США). Кон'югований з KLH білок все ще зберігав здатність взаємодіяти з VEGFR1, VEGFR2 і бевацизумабом, це підтверджує, що відповідні епітопи VEGF165 все ще були доступними.

Приклад 1

Імунізація з використанням різних форматів VEGF індукує гуморальну імунну відповідь у лам

1.1 Імунізація

Після схвалення Комітетом з етики департаменту ветеринарної медицини (Університет Гента, Бельгія), імунізували 4 лам (позначені № № 264, 265, 266, 267) згідно стандартних протоколів, здійснюючи 6 внутрішньом'язових ін'єкцій (100 або 50 мкг / дозу з тижневими інтервалами) рекомбінантного людського VEGF109. Для першої ін'єкції у день 0 застосовували форму у повному Ад'ювант Фрейнда (фірма Difco, Детройт, шт. Мічиган, США), а для наступних ін'єкцій застосовували форму у неповному Ад'ювант Фрейнда (фірма Difco, Детройт, шт. Мічиган, США). Крім того, імунізували чотирьох лам (позначені № № 234, 235, 280 і 281) відповідно до наступного протоколу: 5 внутрішньом'язових ін'єкцій з використанням кон'югованого з KLH людського VEGF165 (100 або 50 мкг / дозу з двотижневими інтервалами) з чотирма подальшими внутрішньом'язовими ін'єкціями людського VEGF109 (перша доза 100 мкг, потім через 2 тижні три ін'єкції з використанням 50 мкг / дозу з тижневими інтервалами).

1.2 Оцінка індукованих VEGF імунних відповідей у лам

Для моніторингу VEGF-специфічних сироваткових титрів застосовували аналіз ELISA, при здійсненні якого взятий у концентрації 2 мкг / мл рекомбінантний людський VEGF165 або VEGF109 імобілізували протягом ночі при 4 ° С у 96-лунковому планшеті MaxiSorp (фірма Nunc, Вісбаден, Німеччина). Лунки блокували розчином казеїну (1%). Після додавання розведень сироватки виявляли пов'язаний загальний IgG, використовуючи кон'юговане з пероксидазою із хрому (HRP) козяче антитіло до імуноглобуліну лам (фірма Bethyl Laboratories Inc., Монтгомері, шт. Техас, США) і здійснюючи подальшу ферментативну реакцію у присутності субстрату TMB (3,3', 5,5'-тетраметілбензидін) (фірма Pierce, Рокфорд, шт. Іллінойс, США). Для лам № № 264, 265, 266 і 267 здійснювали додатковий аналіз методом ELISA, у якому оцінювали специфічні для ізотипу відповіді проти VEGF165 і VEGF109. Специфічні для ізотипу відповіді виявляли з використанням мишачих МАт, специфічно розпізнаючих канонічний IgG1 лам і що складаються тільки з важкого ланцюга IgG2 і IgG3 лам (Daley та ін, Clin. Diagn. Lab. Imm. 12, 2005, сс. 380-386), після чого використовували кроляче антимишаче антитіло, кон'югованого з HRP (фірма DAKO). Для візуалізації отриманих з допомогою ELISA результатів використали TMB у якості хромогенного субстрату і визначали абсорбцію при 450 нм. Дані про титрах у сироватці кожної лам представлені у таблиці 1.

Таблиця 1: Антитіло-обумовлена специфічна сироваткова відповідь на обробку VEGF165 і VEGF109

ELISA (тверда фаза сенсibilізована рекомбінантним білком)

Лама	Імуноген	Рекомбінантний людський VEGF165				Рекомбінантний людський VEGF109			
		Загальний IgG	IgG1	IgG2	IgG3	Загальний IgG	IgG1	IgG2	IgG3
234	VEGF165-KLH VEGF109	++	n/d	n/d	n/d	++	n/d	n/d	n/d
235	VEGF165-KLH VEGF109	++	n/d	n/d	n/d	++	n/d	n/d	n/d
280	VEGF165-KLH VEGF109	+	n/d	n/d	n/d	+	n/d	n/d	n/d

Лама	Імуноген	Рекомбінантний людський EGF165				Рекомбінантний людський VEGF109			
		Загальний IgG	IgG1	IgG2	IgG3	Загальний IgG	IgG1	IgG2	IgG3
281	VEGF165-KLH VEGF109	+	n/d	n/d	n/d	+	n/d	n/d	n/d
264	VEGF109	n/d	++	+	+	++	++	+	+
265	VEGF109	n/d	++	+	+	+	++	+	+
266	VEGF109	n/d	++	+	+/-	++	++	+	+/-
267	VEGF109	n/d	+/-	-	-	+/-	+/-	-	-

n/d: не визначали

Приклад 2

Клонування популяцій що містять тільки важкий ланцюг фрагментів антитіл та отримання фагу

- 5 Після останньої ін'єкції імуногену отримували зразки імунних тканин імунізованих лам як джерело В-клітин, які продукували антитіла з важким ланцюгом. Як правило, збирали по два 150-мілілітрових зразка крові через 4 і 8 днів після останньої ін'єкції антигену і у кожної тварини отримували біопсію одного лімфатичного вузла через 4 дні після останньої ін'єкції антигену. Із зразків крові отримували мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC), використовуючи
- 10 фіколл-пак згідно з інструкціями виробника (фірма Amersham Biosciences, Піскатавей, шт. Нью-Джерсі, США). З PBMC і біопсії лімфатичних вузлів екстрагували загальну РНК, яку застосовували у якості вихідного матеріалу для ампліфікації за допомогою ОТ-ПЛР кодуєть VHH ДНК-сегментів згідно з методом, наведеним у WO 2005/044858. Для кожної імунізованої лами конструювали бібліотеку шляхом об'єднання загальної РНК, виділеної з усіх зібраних
- 15 зразків імунних тканин кожної тварини. у цілому, метод полягав наступному: популяцію ампліфікованих за допомогою ПЛР VHH клонували з використанням специфічних сайтів рестрикції у векторі, створеному для полегшення фагового дисплея бібліотеки VHH. Вектор виводили з pUC119, і він містив промотор LacZ, послідовність, що кодує білок gIII фагу M13, ген, що обумовлює стійкість до ампіциліну або карбеніциліну, сайт множинного клонування і
- 20 гібридну лідерну послідовність gIII-pelB (pAX050). У рамках зчитування із кодує послідовністю VHH вектор кодував С-кінцеву с-тус-мітку і His6-позначку. Фаг отримували згідно стандартних протоколів і зберігали після стерилізації фільтрацією при 4 ° C для подальшого застосування.

Приклад 3

Селекція VEGF-специфічних VHH за допомогою фагового дисплея

- 25 Фагові бібліотеки VHH застосовували для різних стратегій селекції, використовуючи різні умови селекції. Варіювали наступні компоненти: I) формат білку VEGF (rhVEGF165, rhVEGF109 або gmVEGF164), II) метод презентації антигену (твердофазний метод: безпосередньо на сенсibiliзованих планшетах або через біотинову мітку на сенсibiliзованих нейтравідином планшетах; або рідиннофазний метод: інкубація у розчині з подальшою імобілізацією на
- 30 сенсibiliзованих нейтравідином планшетах), III) концентрацію антигену і IV) метод елюції (елюція з використанням трипсину або конкурентна елюція з використанням VEGFR2). Всі селекції здійснювали у 96-лункових планшетах Maxisorp (фірма Nunc, Вісбаден, Німеччина).

- Селекції здійснювали наступним чином: фагові бібліотеки інкубували при КТ з узятим у різних концентраціях антигеном VEGF, або знаходяться у розчині, або імобілізованим на
- 35 твердій підкладці. Після інкубації протягом 2 год з подальшою інтенсивною відмивкою елюювали пов'язаний фаг. Коли для фагової елюції застосовували трипсин, то протеазну активність відразу ж нейтралізували, застосовуючи 0,8 мМ протеазний інгібітор ABSF. Збори фагу, збагачені у порівнянні з фоновим рівнем (контроль без антигену), застосовували для зараження *E. coli*. Заражені клітини *E. coli* або застосовували для отримання фагу для наступного циклу
- 40 селекції (збереження («порятунок») фага), або висували на агарових пластини (LB + amr + глюкоза (2%)) для аналізу індивідуальних клонів VHH. Для скринінгу продукту селекції щодо специфічних зв'язуючих агентів індивідуальні колонії вилучали з агарових пластин і вирощували у обсязі 1 мл у 96-лункових планшетах з глибокими лунками. Контрольовану LacZ експресію VHH індукували, додаючи IPTG (кінцева концентрація 0,1-1мм). Отримували екстракти вмісту
- 45 периплазматичного простору (периплазматичні екстракти) (в обсязі ~ 80 мкл) згідно стандартних методів.

Приклад 4

Ідентифікація зв'язуючих VEGF і блокуючих VEGF-рецептор VHH

Периплазматичні екстракти тестували щодо зв'язування з людським VEGF165 за допомогою ELISA. у цілому, метод полягав у наступному: рекомбінантний людський VEGF165 (2 мкг / мл) імобілізували при 4 ° C у 96-лунковому планшеті MaxiSorp (фірма Nunc, Вісбаден, Німеччина). Лунки блокували за допомогою розчину казеїну (1%). Після додавання, як правило, 10-кратного розведення периплазматичних екстрактів зв'язування VHH оцінювали з використанням мишачого антитіла до тус (фірма Roche) і антимишачого антитіла, кон'югованого з HRP (фірма DAKO). Клоні, для яких ELISA-сигнали більш ніж у 3 рази перевищували фонові, розглядали як клони VHH, що мають здатність зв'язувати VEGF.

Крім того, периплазматичні екстракти піддавали скринінгу щодо взаємодії людської VEGF165/людської VEGFR2 з використанням AlphaScreen-аналізу (гомогенний аналіз посиленої за рахунок ефекту близькості люмінісценції) для оцінки блокуючої здатності VHH. Людський VEGF165 біотинілювання за допомогою реагенту сульфо-NHS-LC-біотин (фірма Pierce, Рокфорд, шт. Іллінойс, США). Химеру людської VEGFR2/Fc (фірма R & D Systems, Міннеаполіс, шт. Міннесота, США) імобілізували за допомогою VHH до людської Fc-ділянки, який зшивали з акцепторними гранулами згідно з інструкціями виробника (фірма Perkin Elmer, Валтхам, шт. Массачусетс, США). Для оцінки нейтралізуючої здатності VHH периплазматичні екстракти розводили у співвідношенні 1/25 у ЗФР-буфері, що містить 0,03% Твін 20 (фірма Sigma-Aldrich), і попередньо інкубували з 0,4 нМ біотинільованим людським VEGF165 протягом 15 хв при кімнатній температурі (КТ). Для цієї мети додавали суміш акцепторних гранул (10 мкг / мл) і 0,4 нМ VEGFR2-huFc і додатково інкубували протягом 1 год при КТ у темряві. Потім додавали донорські гранули (10 мкг / мл) з подальшою інкубацією протягом 1 год при КТ у темряві. Флуоресценцію вимірювали за допомогою планшет-рідера типу Envision Multilabel (фірма Perkin Elmer, Уолт, шт. Массачусетс, США), при довжині хвилі збудження 680 нм і довжині хвилі випускання від 520 до 620 нм. Периплазматичні екстракти, що містять «невідповідний» VHH, застосовували як негативний контроль. Периплазматичні екстракти, що містять анти-VEGF165 VHH, які мали здатність знижувати флуоресцентний сигнал більш ніж на 60% щодо сигналу, відповідного негативного контролю, розглядали як відповідні вимогам («хіти»). Всі «хіти», ідентифіковані за допомогою AlphaScreen, підтверджували з використанням конкурентного ELISA. Для цієї мети химеру (1 мкг / мл), що містить людської VEGFR2 (фірма R & D Systems, Міннеаполіс, шт. Міннесота, США), застосовували для сенсibilізації 96-лункового планшета MaxiSorp (фірма Nunc, Вісбаден, Німеччина). П'ятикратні розведення периплазматичних екстрактів інкубували у присутності біотинільованого людського VEGF165 у фіксованій концентрації (4нМ) у ЗФР-буфері, що містить 0,1% казеїну і 0,05% Твін 20 (фірма Sigma-Aldrich). Зв'язування цих комплексів VHH/bio-VEGF165 с планшетом, сенсibilізованим химерою, містить людський VEGFR2, виявляли за допомогою кон'югованого з пероксидазою із хрому (HRP) екстравідину (фірма Sigma, Сент-Луїс, шт. Міссурі, США). Ідентифікаційні номери (ID) VHH-послідовностей і відповідні АК-послідовності VEGF-зв'язуючих (не блокуючих рецептор) VHH та інгібуючих (блокуючих рецептор) VHH представлені у таблиці 2 і таблиці 3 відповідно.

Таблиця 2: ID послідовностей і АК-послідовності одновалентних «не блокуючих рецептор» анти-VEGF VHH (FR, каркасна ділянка; CDR, гіперваріабельна ділянка)

VHH ID/ SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBII 01C02/58	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCTASGGS FS	SYGMG	WFRQSPGKER EFVS	AISEYSNTYCSDS VRG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLTPDDTAIYYCAA	SPTILLTTEQWYKY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 01E07/59	EVQLVESGGGLVQA GDSLRLSCVATGRT FR	ASDMG	WFRQAPGKER EFVA	AINWSGLSTFYTD SVKG	RFTISRDNNGALYLQMN TLKPEDTAVYSCAA	GRIPSSSRFSSPAAYAS	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 03D12/60	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCTASTSI YT	ITVMA	WFRQAPGKER EFVA	AITWSAPTYYAD SVKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDSAIYYCAA	DRFKGRSIVTPSDYRY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 04B08/61	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGSA VG	DITVA	WYRQAPGIQR QLVA	TIIPSGYTYWDF VKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAAYYCNT	QFY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 05B02/62	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	TDDVG	WFRQAPGKER EFVA	VIRWSTGGTYTSD SVKG	RFTLSRDNKNTMYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	RSRPLGAGAWYSGEKHYN Y	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 05B03/63	EVQLVESGGGLAQA GDSLRLSCAASGRS FS	HYNMG	WFRQAPGKER EFVA	SIRGGGGSTTYAN SVKD	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	TAFYRGPYDYDY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 05B05/64	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCVASGIR FM	SMA	WYRQAPGKQR ELVA	RISGGGTAYVDS VKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKAEDTAVYYCNT	FSSRPNP	WGAGTQVT VSS
VEGFBII 06G02/65	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGNI FS	NNAMA	WYRQAPGKQR ELVA	RISGGGGTYTLD SVKG	RFTVSRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCNA	AYRTYNY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 07A03/66	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASSTSI YS	ITVMA	WFRQAPGKER EFVA	AITWSAPSSYYAD SVKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDSAIYYCAA	DRFKGRSIVTRSDYKY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 07A06/67	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAVSTSI YS	ISVMA	WFRQAPGKER AFVA	AITWSAPTYYAD SVKG	RFTISRDNKNTVYLQTN SLKPEDSAIYYCAA	DRFKGRSIVTRSDYRY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 07D08/68	EVQLVESGGGLVQT GGSLRLSCAASGRT FS	NYAMA	WFRQAPGKER EFVS	AINQRGSNTNYAD SVKG	RFTISRDSAKNSVFLQMN SLKPEDTAVYYCAA	STWYGSTYARREEYRY	WGQGTQVT VSS
VHH ID/ SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBII 08D09/69	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRS FS	DNVMG	WFRQAAGKER EFVA	HISRGGSRTEYAE SVKG	RFTISRDNKTKMYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	SRVALATARPYDY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 08E07/70	EVQLVESGGGLAQA GGSLRLSCTTSGLT FS	SYIMG	WFRQAPGKER EFVA	TISWNKISTIYTD SVKG	RFTVSRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	DASRPTLRIPQY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 08F06/71	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGSI VR	SDVMG	WYRQAPGKQR ELVA	FIRSLGSTYYAGS VKG	RFTISRDDAANTVYLQMN NLKPEDTAVYYCNA	RFSGESY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 08F07/72	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAVSGST FG	LYAMG	WFRQAPGRER EFLS	AITWSAGDTQYAD SVKG	RFTISRDNARNTVNLQMN GLKPEDTAVYYCAG	QWGGTYYYHGSYAY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 09A09/73	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCVASGIR FM	SMA	WYRQAPGKQR ELVA	RISSEGTAYVDS VKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKAEDTAVYYCNT	FSSRPNP	WGAGTQVT VSS
VEGFBII 09A12/74	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	TDDVG	WFRQAPGKER EFVA	VIRWSTGGTYTSD SVAG	RFTLSRDNKNTMYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	RSRPLGAGAWYTGETRYD S	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 09D05/75	EVQLVESGGGLVQP GDSLRLSCAASGLS FS	RYGMG	WFRQAPGKER EFVI	AISEYDNVYTADS VRG	RFTISRDNKSTVYLQMN SLKSEDTAVYYCAA	SPTILLSTDEWYKY	WGRGTQVT VSS
VEGFBII 09F05/76	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	TDDVG	WFRQAPGKER EFVA	VIRWSTGGTYTSD SVKG	RFTLSRDNKNTMYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	RSRPLGAGAWYTGETRYN Y	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 10C07/77	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASARA FS	NYAMG	WFRQVPGRER EFVA	VITRSPSNTYYTD SVKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	HYWNSDSYTYTDSRWYNY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 10E07/78	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	NYAMG	WFRQAPGKER VLVA	DISSSGINTYVAD AVKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	SAWWYSQMARDNYRY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 10G04/79	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGDT LS	RYAMG	WFRQAPGKER EFVA	SINTSGKRTSYAD SMKG	RFAVSRDNKNTGYLQMN SLKLEDATYYCAA	DRFFGSDSNEPRAYRY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 10G05/80	EVQLVESGGGLVQA GESLRLSCVASGIT FS	NYNMG	WFRQAPGKER EFVA	TIRHHGYDTYYAE SVKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDTALYSCAK	KLFWDMDPKTFSS	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 11C08/81	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT LS	SYGLG	WFRQAPGKER EFVA	AIGWSGSSTYYAD SVKG	RFTVSRDNKNTVYLQMN SLEPEDTAVYYCAA	KVRNFNSDWDLLTSYNY	WGQGTQVT VSS

VHH ID/ SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBII 11C11/82	EVQLVESGGGLVQA GGSLMLSCAASGRA LS	SYAIG	WFRQAPGRER EFVA	RISWSGANTYYAD SVKG	RFTISRGNNAKNTVYLQMN SLKPEDTAAYYCAA	QTTSKYDNYDARAYGY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 11D09/83	EEQLVESGGGLVQA GGSLMLSCAASGRA LS	SYAIG	WFRQAPGRER EFVA	RISWSGANTYYAD SVKG	RFTISRGNNAKNTVYLQMN SLKPEDTAAYYCAA	QTTSKYDNYDARAYGY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 11E04/84	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	SYAMG	WFRQAPGKER EFVA	TISQSGYSTYYAD SVKG	RFTISRDNNAKNTVNLQMN SLKPEDTAVYYCAA	DPFYSGSPSPYRY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 11E05/85	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGRL FS	FSAMG	WFRQAPGKER EFVA	AFKWSGSTYYAD YVKG	RFTISTDNNAKNTVNLQMN SLKPEDTAIYYCAV	DRFYTGRYSSDEYDY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 11F10/86	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASTSI YS	ITVMA	WFRQAPGKER EFVA	AITWSAPSSYYAD SVKG	RFTISRDNNAKNTVYLQVN SLKPEDSAIYYCAA	DRFKGRSIVTRSDYRY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 11F12/87	EVQLVESGGGLVQS GGSLRLSCAASGRS FS	SLAMG	WFRQVPGKDR EFVA	SISQSGITTSYAD SVKS	RFTISRDSAKNTVYLQMN LLKPEDTAVYYCAT	SVFYSTALTRPVDYRY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 11G09/88	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASTSI YS	ITVMA	WFRQAPGKER EFVA	AITWSAPTYYAD SVKG	RFTISRDNNAKNTVYLQMN SLKPEDSAIYYCAA	DRFKGRSIVTRSDYRY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 12A07/89	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCSVTGR FN	KYVMG	WFRQAPGNDR EFVA	AITSRDGGTTYAD SVKG	RFTISGDNNTKNTVFLQMN SLMPEDTAVYYCAI	DEDLYHYSSYHFTVRDLY HY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 12B01/90	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLCAASGFT LS	SSWMY	WVRQAPGKGL EWVS	RISPGGLFTYYVD SVKG	RFSVSTDNANNTVYLQMN SLKPEDTALYSCAK	GGAPNYTP	RGRGTQVT VSS
VEGFBII 12C04/91	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGSI VR	SDVMG	WYRQAPGKQR ELVA	FIRSLGSTYYAGS VKG	RFTISRDNNAKNTVYLQMN NLKPEDTAVYYCNA	RFSGESY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 12E10/92	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FN	NYVMG	WFRQAPGNER EFVA	AITSTNGPTYAD SVKG	RFTISGDNNTKNTVFLQMD SLRPEDTAVYYCAI	DEDLYHYSSYHYTRVALY HY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 12G04/93	EVQLVESGGGLVQS GDSLRLSCAVSGNT FG	LYAMG	WFRQAPGRER EFVS	AITWSAGDTQYAD SVKG	RFTISRDNNAKNTVNLQMN GLKPEDTAVYYCAG	RQWGGTTYHGSYAW	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 16C03/94	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	TDDVG	WFRQAPGKER EFVA	VIRWSTGGTYTSD SVKG	RFTISRDNNAKNTMYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	RSRPLGAGAWYTGNYYN Y	WGQGTQVT VSS
VHH ID/ SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBII 16F11/95	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT SS	GYDMG	WFRQAPGKER EFVT	AITWSGGSTYSPD SVKG	RFTISRDNNAKNTVYLQMN NLTPEDTAVYYCAS	GRIWRSRDYDSEKYYDI	WGHGTQVT VSS
VEGFBII 36C08/96	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	AYDMG	WFRQAPGKER EFVA	VISWTNSMTYYAD SVKG	RFTISRDNNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAV	DRRTYSRWRYTGVNDY DY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 37F09/97	EVQLVESGGGLVQT GGSLRLSCAASGRT FS	AYDMG	WFRQAPGKER EFVA	VISWSGGMTYYAD SVQG	RFTISRDNNAKNTVYLQMN SPKPEDTAVYYCAV	DRRRAYSRWRYTGVNDY EF	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 38A06/98	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	AYDMG	WFRQAPGKER EFVA	VISWSGGMTYYAD SVKG	RFTISRDNNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAV	DRRLYSRWRYTGVNDY DY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 39H11/99	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	AYDMG	WFRQAPGKER EFVA	VISWTGGMTYYAD SVKG	RFTISRDKAKNTVSLQMN SLKPEDTAVYYCAV	DRRTYSRWRYTGVNEY EY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 41B06/ 100	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	AYDMG	WFRQAPGKER EFVA	VISWTGDMTYYAD SVKG	RFTISRDKAKNTVSLQMN SLKPEDTAVYYCAA	DRRTYSRWRYTGVNEY EY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 41C05/ 101	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	VYTMG	WFRQAPGKER EFVA	TISRTGDRTSYAN SVKG	RFTISRDNNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYSCAA	GPIAPSPRPREYYY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 41D11/ 102	EVQLMESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	AYDMG	WFRQAPGKER EFVA	VISWTGGMTYYAD SVKG	RFTISRDKAKNTVSLQMN SLKPEDTAVYYCAV	DRRTYSRWRYTGVNEY EY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 42F10/ 103	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FS	AYDMG	WFRQAPGKER EFVA	VISWSGGMTDYAD SVKG	RFTISRDNNAKNTQFLQMN SLKPEDTAVYYCAV	GRRRAYSRWRYTGVNEY DY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 86C11/ 104	EVQLVESGGGLVQA GDSLRLSCAASGRT FN	SYAMG	WFRQAPGKER ESVA	HINRSGSSTYYAD SVKG	RFTISRDNNAKNTVYLQNL SLKPEDTAVYYCAA	GRYYSSDGVPSASFNY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 86F11/ 105	EVQLVESGGGLVQA GDSLRLSCFTSART FD	TWAMA	WFRQAPGKER EFIS	AISWSGSMTYYTD SVKG	RFTISRDNNAKNTVFLQMN NTAPEDTAVYYCAA	KTVDYCSAYECYARLEYD Y	WGRGAQVT VSS
VEGFBII 86G08/ 106	EVQLVESGGGLMQT GDSLRLSCAASGLR FT	STNMG	WFRQGPGRER EFVA	AITLSGTTYAEA VKG	RFTISRDNNAKNTVALQMN SLKPEDTAVYYCGA	DPSYYSTSRYTKATEYDY	WGQGTQVT VSS

VHH ID/ SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBII 86G10/ 107	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRT FN	TYTMG	WFRQTPGTER EFVA	AIRWTVNITYYAD SVKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	QTSAPRSLIRMSNEYFY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 86G11/ 108	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGLT FS	LYTVG	WFRQAPGKER EFVA	YISRSGSNRYIVD SVKG	RFTLSRDNAKNTVYLQMN SLKTEDTAVYYCAA	TSRGLSSLAGEYNY	WGRGTQVT VSS
VEGFBII 86H09/ 109	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCTASGSA FK	SYRMG	WFRRTPGKED EFVA	SISWTYGSTFYAD SVKG	RFTMSRDKAKNAGYLQMN SLKPEDTALYYCAA	GAQSDRYNIRSYDY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 87B07/ 110	EVQLVESGGGLVQP GGSLKLSCASGFT FS	TSMWH	WVRQAPGKGL EWVS	SIPPVGHFANYAP SVKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKSEDATVYYCAK	DSAGRT	KGQGTQVT VSS
VEGFBII 88A01/ 111	KVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASERT FS	NYAMD	WFRQAPGKER EFVA	AITRSGGGTYAD SVKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	TRSSITIVGVGGMEY	WGKGTLT VSS
VEGFBII 88A02/ 112	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGFT FG	DYDIG	WFRQAPGNER EGVS	CITTDVGTYYAD SVKG	RFTISSDNKNTVYLQIN DLKPEDTAIYYCAV	DTQDLGLDIFCRGNGFPD G	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 88B02/ 113	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCTASGLN LD	DYAIG	WFRQAPGKER EGVS	CISSYDSVTYYAD HVKG	RFTISRDSAKNTLYLQMN SLSIEDTGYYCAA	EREQLRRRESPHDELLRL CFYGMRY	SGKGTLT VSS
VEGFBII 88E02/ 114	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCVASGFR LD	DYAIG	WFRQAPGKER EAVS	CISSSDTSIDYTN SVKG	RFTFSRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	AFRCSGYELRGFPPT	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 88G03/ 115	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGGT FS	SLAVG	WFRQAPGKER EFVA	RITWSGATTYYAD AVKD	RFTISRDNKNTMYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	DRSPNIINVVTAYEYDY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 88G05/ 116	EVQLVESGGGLVQP GASLRSCAASGDG FT	LYNMG	WFRQAPGKER EFVA	AITSSPMSTYYAD SVKG	RFSISINNDKITGFLQMN VLKPEDTGYYFCAA	PEGSFRRQYADRAMYDY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 88G11/ 117	EVQLVESGGGLAQA GGSLRLSCAASGRT FS	GSDMG	WFRQSPGKER EIVA	AIRLSGSITYYPD SVKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	RSTYSYYLALADRGGYDY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 88H01/ 118	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCVASGFT LG	TYAIG	WFRQAPGKER EAVS	CMSAGDSIPWYTA SVKG	RFTTSTDNAKNTVYLQMN SLKPEDTAHYCAA	ARYHGDYCYEYGYYPF	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 89B04/ 119	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASSTSI SS	TNFMG	WYRQAPGKQR ELVA	TITSSSITNYVDS VKG	RFTISRDNKNTVYLQMT SLKPEDTAVYYCHA	RWRWSDVEY	WGKGTLT VSS
VHH ID/ SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBII 89B08/ 120	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGTT SS	IFAMR	WYRQAPGKQR ELVA	SITRSSITYYADS VKG	RFTPSRDNKNTVSLQMN SLKPEDTAVYYCNA	AIRPELYSVVNDY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 89D04/ 121	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCATSGLT FS	DYNLG	WFRQAPGKER QFVA	VISWRDSFAYYAE PVKG	RFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAA	DRVSSRLVLPNTSPDFGS	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 89F09/ 122	EVQLVESGGGLVQA GDSLRLSCAASGRT FN	NAIMG	WFRQAPGKER EFVA	AMNWRGGPTYYAD SVKG	RFTISGDNKNTVFLQMN FLKPEDTAVYYCAA	DEDLYHYSSYHYSRVDLY HY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 89G09/ 123	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGTT SS	IFAMR	WYRQAPGKQR ELVA	SITRSSITYYADS VKG	RFTLSRDNKNTVSLQMN SLKPEDTAVYYCNA	AIRPELYSVVNDY	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 89H08/ 124	EVQLVESGGGLVQA GGSLRLSCAASGGG FS	SYAPG	WFRQAPGKER EFVA	AFTRSSNIPYYKD SVKG	RFTISRDNKNTVYLQMN LKPEDTAIYYCAV	NLGSTWSRDQRTYDY	WGQGTQVT VSS

Таблиця 3: ID послідовностей і АК-послідовності одновалентних блокуючих рецептор анти-VEGF VHH (FR, каркасна ділянка; CDR, гіперваріабельна ділянка) (SEQ ID NO: 9 – 46)

VHH ID/ SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBII 22A10/9	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQKGEREF VV	AISSSGGYIYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQT PSLKPEDTADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 22A11/10	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFS	SYSMA	WFRQAQKGEREF VV	AISSSGGFIYDAV SLEG	RFTISRDNKNTVYLQT PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 22B06/11	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAASG RTFS	SYSMG	WFRQAQKGEREF VV	AISSSGGYIYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQT PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 22B07/12	EVQLVESGGGLVQ AGDSLRLSCAASG RTFS	SYSMG	WFRQAQKGEREF VV	AISSSGNYKYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQI NSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 22E04/13	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCVASG RTSS	SYSMG	WFRQAQKGEREF VV	AISSSGGSIYDSV SLQG	RFTISRDNKNTVYLQT PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYASSRLRLADTYD Y	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 23A03/14	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCVASG RTFS	SYSMG	WFRQAQKGEREF VV	AISSSGGYIYDSV SLQG	RFTISRDNKNTVYLQT PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 23A06/15	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQKGEREF VV	AISSSGGFIYDAV SLEG	RFTISRDNKNTVYLQT PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 23A08/16	EVQLVESGGGLVQ TGDSLRLSCVASG RTFS	SYSMG	WFRQAQKGEREF VV	AISNGGKYDSV SLEG	RFTISRDNKNTVYLQI NSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 23A09/17	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFG	SYSMG	WFRQAQKGEREF VV	AISSSGGYIYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQT PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 23B04/18	EVQLVESGGGLVQ TGDSLRLSCVSVG RTFS	SYSMG	WFRQAQKGEREF VV	AISKGGKYDSV SLEG	RFTISKDNKNTVYLQI NSLKPEDTAVYYCAS	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVT VSS
VEGFBII 23D11/19	EVQLVESGGGLVQ PGDSLKLSCAFSG RTFS	SYSMA	WFRQAQKGEREF VV	AISSSGGFIYDAV SLEG	RFTISRDNKNTVYLQT PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVT VSS

VHH ID/ SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBI1 23E05/20	EVQLVESGGGLVQ PGDSLRLSCVAFSG RTSS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGYIYDSV SLQG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 23F02/21	EMQLVESGGGLVQ PGDSLRLSCAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGYIYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 23F05/22	EVQLVESGGGLVQ AGDSLRLSCVAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGNYKYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ I NSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 23F11/23	EVQLVESGGGLVQ PGDSLRLSCAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGYIYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 23G03/24	EVQLVESGGGLVQ PGDSLRLSCAFSG RTFG	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGYIYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLPGTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 24C04/25	EVQLVESGGGLVQ PGDSLRLSCVAFSG RTSS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGYIYDSV SLQG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 27D08/26	EVQLVESGGGLVQ TGDSLRLSCVAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGYKYDSV SLEG	RFTISRDNKNTVYLQ I NSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 27G07/27	EVQLVESGGGLVQ PGDSLRLSCVAFSG RTSS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGYIYDSV SLQG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 30C09/28	EVQLVESGGGLVQ PGDSLRLSCVAFSG RTSS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGYIYDSV SLQG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 30E07/29	EVQLVESGGGLVQ AGDSLRLSCVAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGNYKYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ I NSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 31C07/30	EVQLVESGGGLVQ TGDSLRLSCVAFSG GTFSS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGYIYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 39E02/31	EVQLVESGGGLVQ PGDSLRLSCVAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGYIYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 39G04/32	EVQLVESGGGLVQ AGDSLRLSCVAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGNYKYDS ASLEG	RFTISRDNKNTVYLQ I NSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VHH ID/ SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBI1 40F02/33	EVQLVESGGGLVQ PGDSLRLSCVAFSG RTFS	SYSMA	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGFIYDAV SLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 40G07/34	EVQLVESGGGLVQ PGDSLRLSCVAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGYIYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 40H10/35	EVQLMESGGGLVQ PGDSLRLSCVAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGYIYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 41B05/36	EVQLVESGGGLVQ PGDSLRLSCVAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGFIYDAV SLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 41G03/37	EVQLVESGGGLVQ PGDSLRLSCVAFSG RTFS	SYSMA	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGFIYDAV SLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 42A05/38	EVQLVESGGGLVQ PGDSLRLSCVAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGYIYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ M PSLKPEDTADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 42D05/39	EVQLVESGGGLVQ PGDSLRLSCVAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGYIYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 42F11/40	EVQLVESGGGLVQ PGDSLRLSCVAFSG RTSS	SYSVG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGYIYDSV SLQG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 56E11/41	EVQLVESGGGLVQ PGDSLRLSCVAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGYIYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDAADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 60A09/42	EVQLVESGGGLVQ PGDSLRLSCVAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGYIYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTADYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 61A01/43	EVQLVESGGGLVQ AGDSLRLSCVAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGYKYDAV SLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYASSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 62A09/44	EVQLVESGGDLVQ PGDSLRLSCVAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGGYIYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VEGFBI1 62D10/45	EVQLVESGGGLVQ AGDSLRLSCVAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AISSSGNYKYDS VSLEG	RFTISRDNKNTVYLQ I NSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S
VHH ID/ SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBI1 62F02/46	EVQLVESGGGLVQ PGDSLRLSCVAFSG RTFS	SYSMG	WFRQAQGGKERE VV	AIASGGYIYDAV SLEG	RFTISRDNKNTVYLQ T PSLKPEDTAVYYCAA	SRAYGSSRLRLADTYD Y	WGQGTQVTVS S

- 5 Швидкості дисоціації інгібуючих VHH аналізували за допомогою Біасоре-аналізу (пристрій Біасоре T100, фірма GE Healthcare). Буфер HBS-EP + застосовували у якості рухомого буфера і експерименти проводили при 25 ° С. Реконбінантний людський VEGF165 необоротно імобілізували на сенсорному чіпі CM5 допомогою амінного поєднання (використовуючи EDC і NHS) до досягнення необхідного рівня + / - 1500RU. Після імобілізації поверхню дезактивували за допомогою 10-хвилинної ін'єкції 1M етаноламіну, pH 8,5. Референс-поверхню активували і
- 10

дезактивували за допомогою EDC / NHS і етаноламіну відповідно. Периплазматичні екстракти, що містять VHH, ін'єктували у вигляді 10-кратного розведення у рухомому буфері протягом 2 хв зі швидкістю потоку 45 мкл / хв і давали пройти реакції дисоціації протягом 10 або 15 хв. Між введеннями різних зразків поверхні регенерували за допомогою буфера для регенерації. Дані співвідносили з двома референс-варіантами шляхом вирахування кривих, відповідних референс-каналу, і відповідних «порожньому» варіанту, для створення якого здійснювали ін'єкцію тільки рухомого буфера. Оброблені криві оцінювали шляхом підгонки з використанням моделі двофазного розщеплення за допомогою програмного забезпечення Biacore T100 Evaluation v2.0.1. величини K_d для швидкої фази і K_d для повільної фази і % швидкої фази наведені у таблиці 4.

Таблиця 4: Швидкості дисоціації блокуючих рецептор анти-VEGF VHH, визначені за допомогою Biacore-аналізу

В-клітинна лінія диференційовки	Унікальний варіант послідовності	ID репрезентативних VHH	K_d (швидка фаза)	K_d (повільна фаза)	% швидкої фази	Рівень зв'язування (RU)
1	1	VEGFBII22B07	1,50E-02	7,80E-05	31	328
1	2	VEGFBII23A08	1,30E-02	5,00E-05	19	502
1	3	VEGFBII23B04	8,80E-03	4,00E-05	12	768
1	4	VEGFBII27D08	2,40E-02	8,10E-05	13	225
1	5	VEGFBII24C04	1,30E-02	3,40E-05	17	456
1	6	VEGFBII27G07	1,30E-02	3,80E-05	18	471
1	7	VEGFBII22E04	1,80E-02	1,10E-04	14	520
1	8	VEGFBII23A03	1,50E-02	3,20E-05	15	487
1	9	VEGFBII22B06	3,80E-02	9,00E-05	23	168
1	10	VEGFBII23A09	2,70E-02	4,60E-05	20	247
1	11	VEGFBII23G03	2,80E-02	8,60E-05	28	141
1	12	VEGFBII22A11	2,20E-02	4,70E-05	12	461
1	13	VEGFBII23A06	1,70E-02	3,70E-05	13	547
1	14	VEGFBII23F11	2,70E-02	1,30E-04	22	134
1	15	VEGFBII22A10	3,70E-02	4,00E-05	19	229
1	16	VEGFBII23F05	1,60E-02	1,30E-04	29	198
1	17	VEGFBII23D11	1,90E-02	5,80E-05	13	510
1	18	VEGFBII23F02	N/d	n/d	n/d	n/d
1	19	VEGFBII23E05	1,50E-02	6,90E-05	18	275
1	20	VEGFBII31C07	3,70E-02	1,50E-04	25	77
1	21	VEGFBII30C09	1,50E-02	7,60E-05	19	264
1	22	VEGFBII30E07	1,70E-02	1,30E-04	29	226
1	23	VEGFBII39G04	1,40E-02	7,40E-04	40	210
1	24	VEGFBII41G03	1,20E-02	2,70E-04	20	332
1	25	VEGFBII41B05	1,90E-02	1,20E-04	16	324
1	26	VEGFBII40F02	1,20E-02	9,80E-05	20	258
1	27	VEGFBII39E02	1,90E-02	2,40E-04	13	181
1	28	VEGFBII42D05	3,30E-02	1,50E-04	26	77
1	29	VEGFBII40G07	1,80E-02	3,20E-04	19	139
1	30	VEGFBII42A05	1,60E-02	3,40E-04	25	118
1	31	VEGFBII42F11	9,10E-03	5,00E-04	46	100
1	32	VEGFBII40H10	1,40E-02	2,90E-04	17	200
1	33	VEGFBII62A09	4,10E-02	1,10E-04	23	84
1	34	VEGFBII60A09	3,70E-02	9,30E-05	20	106

В-клітинна лінія диференційовки	Унікальний варіант послідовності	ID репрезентативних VHH	K_d (швидка фаза)	K_d (повільна фаза)	% швидкої фази	Рівень зв'язування (RU)
1	35	VEGFBII62F02	1,40E-02	8,50E-05	21	205
1	36	VEGFBII62D10	1,90E-02	1,60E-04	40	94
1	37	VEGFBII61A01	7,40E-03	1,70E-04	21	275
1	38	VEGFBII56E11	3,30E-02	1,40E-04	24	76

n/d, не визначали

Приклад 5

Характеризація очищених анти-VEGF VHH

5 Три такі, що мають інгібуючу дію анти-VEGF VHH VEGFBII23B04, VEGFBII24C4 і VEGFBII23A6 відбирали для додаткової характеризації у вигляді очищених білків. Ці VHH експресували у клітинах *E. coli* TG1 у вигляді мічених с-тис, His6 білків. Експресію індукували шляхом додавання 1мМ ІПТГ і давали здійснюватися протягом 4 год. при 37 ° С. Після центрифугування клітинних культур отримували периплазматичні екстракти шляхом заморожування-відтавання дебриса. Ці екстракти використовували у якості вихідного матеріалу для очищення VHH за допомогою IMAx (хроматографія на імобілізованому металі) і гел-фільтрації (ГФ). Кінцеві VHH-препарати мали чистоту 95% за даними аналізу методом ДСН-ПААГ.

15 5.1 Оцінка здатності VHH блокувати взаємодію: людський VEGF165/VEGFR2 за допомогою ELISA, призначеного для визначення блокуючої дії відносно взаємодії: людський VEGF165/людський VEGFR2-Fc

20 Блокуючу здатність VHH оцінювали за допомогою ELISA, призначеного для визначення блокуючої дії відносно взаємодії: людський VEGF165/людської VEGFR2-Fc. у цілому, метод полягав у наступному: що містить VEGFR2-Fc химеру (1 мкг / мл) (фірма R & D Systems, Міннеаполіс, шт. Міннесота, США) застосовували для сенсibilізації 96-лункового планшета MaxiSorp (фірма Nunc, Вісбаден, Німеччина). серії розведень (в діапазоні концентрацій від 1мМ до 64пМ) очищених VHH у ЗФР-буфері, що містить 0,1% казеїну і 0,05% Твін 20 (фірма Sigma), інкубували у присутності 4нМ біотинільованого VEGF165. Залишковий зв'язування bio-VEGF165 з VEGFR2 виявляли за допомогою кон'югованого з пероксидазою із хрому (HRP) екстрактиву (фірма Sigma, Сент-Луїс, шт. Міссурі, США) і ТМВ як субстрат. у якості контролів застосовували паралельно бевацизумаб (Avastin®) і ранібізумаб (Lucentis®). Криві залежності інгібування від дози представлені на фіг. 1, відповідні значення IC₅₀ і величини відсотка інгібування узагальнені у таблиці 5.

30 Таблиця 5: Значення IC₅₀ (нМ) та% інгібування для одновалентних VHH, встановлені за допомогою конкурентного ELISA, що характеризують здатність інгібувати взаємодію hVEGF165/hVEGFR2-Fc

VHH ID	IC ₅₀ (нМ)	% інгібування
VEGFBII23B04	2,1	100
VEGFBII23A06	3,0	100
VEGFBII24C04	2,5	100
ранібізумаб	1,6	100
бевацизумаб	1,7	100

35 5.2 Оцінка здатності VHH блокувати взаємодію: людський VEGF165/VEGFR1 за допомогою ELISA, призначеного для визначення блокуючої дії відносно взаємодії: людський VEGF165/людський VEGFR1-Fc

40 VHH оцінювали також за допомогою ELISA, призначеного для визначення блокуючої дії відносно взаємодії: людський VEGF165/людський VEGFR1-Fc. у цілому, метод полягав у наступному: що містить VEGFR1-Fc химеру (2 мкг / мл) (фірма R & D Systems, Міннеаполіс, шт. Міннесота, США) застосовували для сенсibilізації 96-лункового планшета MaxiSorp (фірма Nunc, Вісбаден, Німеччина). Серії розведень (в діапазоні концентрацій від 1мМ до 64пМ) очищених VHH у ЗФР-буфері, що містить 0,1% казеїну і 0,05% Твін 20 (фірма Sigma), інкубували у присутності 0,5нМ біотинільованого VEGF165. Залишкове зв'язування bio-VEGF165 з VEGFR1

виявляли за допомогою кон'югованого з пероксидазою із хрону (HRP) екстравідину (фірма Sigma, Сент-Луїс, шт. Міссурі, США) і ТМВ як субстрат. у якості контролів у всіх випадках застосовували бевацизумаб, ранібізумаб і невідповідний VHH (2E6). Криві залежності інгібування від дози представлені на фіг. 2; відповідні значення IC_{50} та% інгібування узагальнені у таблиці 6.

Таблиця 6: Значення IC_{50} (нМ) та% інгібування для одновалентних VHH, встановлені за допомогою конкурентного ELISA, що характеризують здатність інгібувати взаємодію: hVEGF165/hVEGFR1-Fc

VHH ID	IC_{50} (нМ)	% інгібування
VEGFBII23B04	0,5	64
VEGFBII23A06	0,9	55
VEGFBII24C04	0,8	71
ранібізумаб	1,2	91
бевацизумаб	1,5	96

5.3 Оцінка анти-VEGF165 VHH за допомогою AlphaScreen-аналізу, призначеного для визначення здатності блокувати взаємодію: людський VEGF165/людський VEGFR2-Fc

Блокуючу здатність VHH оцінювали також за допомогою AlphaScreen-аналізу, призначеного для оцінки блокуючої дії відносно взаємодії: людський VEGF165/людський VEGFR2-Fc. у цілому, метод полягав у наступному: серійні розведення очищених VHH (у діапазоні концентрацій від 200нМ до 0,7 пМ) у ЗФР-буфері, що містить 0,03% Твін 20 (фірма Sigma), додавали до 4пМ bio-VEGF165 і інкубували протягом 15 хв. Потім додавали VEGFR2-Fc (0,4 нМ) і сенсibilізовані анти-Fc VHH акцепторні гранули (20 мкг / мл) і зазначену суміш інкубували протягом 1 год у темряві. І, нарешті, додавали вкриті стрептавідином донорські гранули (20 мкг / мл) і після інкубації протягом 1 год у темряві вимірювали флуоресценцію за допомогою рідера для мікропланшетів типу Envision. Криві дозової залежності представлені на фіг. 3. значення IC_{50} , які характеризують здатність VHH блокувати взаємодію людський VEGF165-людський VEGFR2-Fc, узагальнені у таблиці 7.

Таблиця 7: Значення IC_{50} (пМ) та% інгібування для VHH, встановлені за допомогою конкурентного AlphaScreen, які характеризують здатність інгібувати взаємодію: hVEGF165/hVEGFR2-Fc

VHH ID	IC_{50} (пМ)	% інгібування
VEGFBII23B04	160	100
VEGFBII23A06	250	100
VEGFBII24C04	250	100
Ранібізумаб	860	100

5.4 Оцінка анти-VEGF165 VHH за допомогою AlphaScreen-аналізу, призначеного для визначення здатності блокувати взаємодію: людський VEGF165/людський VEGFR1-Fc

Блокуючу здатність VHH оцінювали також за допомогою AlphaScreen-аналізу, призначеного для оцінки блокуючої дії відносно взаємодії: людський VEGF165/людський VEGFR1-Fc. у цілому, метод полягав у наступному: серійні розведення очищених VHH (у діапазоні концентрацій від 500нМ до 1,8 пМ) у ЗФР-буфері, що містить 0,03% Твін 20 (фірма Sigma), додавали до 4нМ bio-VEGF165 і інкубували протягом 15 хв. Потім додавали VEGFR1-Fc (1нМ) і сенсibilізовані анти-Fc VHH акцепторні гранули (20 мкг / мл) і зазначену суміш інкубували протягом 1 год у темряві. І, нарешті, додавали вкриті стрептавідином донорські гранули (20 мкг / мл) і після інкубації протягом 1 год у темряві вимірювали флуоресценцію за допомогою рідера для мікропланшетів типу Envision. Криві дозової залежності представлені на фіг. 4. значення IC_{50} , які характеризують здатність VHH блокувати взаємодію: людський VEGF165-людський VEGFR1-Fc, і величини% інгібування узагальнені у таблиці 8.

Таблиця 8: Значення IC_{50} (нМ) та% інгібування для VHH, встановлені за допомогою конкурентного AlphaScreen, які характеризують здатність інгібувати взаємодію: hVEGF165/hVEGFR1-Fc

VHH ID	IC ₅₀ (нМ)	% інгібування
VEGFBII23B04	0,9	41
VEGFBII23A06	0,4	46
VEGFBII24C04	0,2	53
ранібізумаб	3,3	79

5.5 Визначення афінності взаємодії: людський VEGF165–VHH

Кінетичні характеристики зв'язування VHH VEGFBII23B4 з hVEGF165 аналізували за допомогою SPR з використанням пристрою Biacore T100. Реконбінантний людський VEGF165 імобілізували безпосередньо на CM5-чипі шляхом амінного поєднання (з використанням EDC і NHS). VHH аналізували у різних концентраціях, що знаходяться у межах від 10 до 360 нМ. Зразки ін'єктували протягом 2 хв і давали пройти реакції дисоціації протягом аж до 20 хв при швидкості потоку 45 мкл / хв. Між ін'єкціями зразків поверхню чипа регенерували за допомогою 100 мм НСІ. HBS-EP + (Нерес-буфер, рН 7,4 + ЕДТК) застосовували у якості рухомого буфера. Криві зв'язування апроксимували за допомогою моделі реакції між двома станами з використанням програмного забезпечення Biacore T100 Evaluation v2.0.1. Дані про розраховані величини афінності анти-VEGF VHH представлені у таблиці 9.

Таблиця 9: Афінність K_D (нМ) очищених VHH до реконбінантного людського VEGF165

VHH ID	VEGF165						
	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{a1} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{a2} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	k _{d1} (s ⁻¹)	k _{d2} (s ⁻¹)	K _D (нМ)
VEGFBII23B04 ^(a)	-	2,1E+05	1,4E-02	-	8,6E-03	2,4E-04	0.7
VEGFBII23A06 ^(a)	-	4,2E+05	2,0E-02	-	5,7E-02	1,0E-04	0.7
VEGFBII24C04 ^(a)	-	3,2E+05	1,8E-02	-	2,6E-02	9,6E-05	0.4

(а) гетерогенна крива зв'язування приводила до неможливості здійснення апроксимації з використанням моделі 1:1, криві апроксимували на основі моделі реакції з двома станами з використанням програмного забезпечення Biacore T100 Evaluation v2.0.1.

5.6 Зв'язування з мишачим VEGF164

Перефресну реактивність з мишачим VEGF164 визначали за допомогою призначеного для оцінки зв'язування ELISA. у цілому, метод полягав у наступному: реконбінантний мишачий VEGF164 (фірма R & D Systems, Міннеаполіс, шт. Міннесота, США) (1 мкг / мл) застосовували для сенсibiliзації протягом ночі при 4 ° С 96-ямкового планшета MaxiSorp (фірма Nunc, Вісбаден, Німеччина). Лунки блокували розчином казеїну (1% у 3ФР). VHH вносили у вигляді серійних розведень (діапазон концентрацій: 500 нМ – 32 нМ) у 3ФР-буфері, що містить 0,1% казеїну і 0,05% Твін 20 (фірма Sigma), і зв'язування оцінювали за допомогою мишачого антитіла до тус (фірма Roche) і антимишачого антитіла, кон'югованого з HRP (фірма DAKO), і подальшої ферментативної реакції у присутності субстрату ТМБ (3,3', 5,5'-тетраметилбензидін) (фірма Pierce, Рокфорд, шт. Іллінойс, США) (фіг. 5). МАт, вступає у реакцію з мишачим VEGF164, застосовували у якості позитивного контролю. Як еталон оцінювали також зв'язування з людським VEGF165. значення EC₅₀ узагальнені у таблиці 10.

Таблиця 10: Значення EC₅₀ (нМ), які характеризують зв'язування VHH з реконбінантним людським VEGF165 і мишачим VEGF164, встановлені за допомогою ELISA

VHH ID	RhVEGF165	RmVEGF164
	EC ₅₀ (нМ)	EC ₅₀ (нМ)
VEGFBII23B04	297	NB
VEGFBII24C04	453	NB
VEGFBII23A06	531	NB

NB, відсутність зв'язування

5.7 Зв'язування з VEGF121

Зв'язування з реконбінантним людським VEGF121 визначали за допомогою ELISA, призначеного для оцінки зв'язування на твердій фазі. у цілому, метод полягав у наступному:

рекомбінантний людський VEGF121 (фірма R & D Systems, Міннеаполіс, шт. Міннесота, США) (1 мкг / мл) застосовували для сенсibiliзації протягом ночі при 4 ° С 96-лункового планшета MaxiSorp (фірма Nunc, Вісбаден, Німеччина). Лунки блокували розчином казеїну (1% у 3ФР). VHH вносили у вигляді серійних розведень (діапазон концентрацій: 500нМ – 32пМ) у 3ФР-буфері, що містить 0,1% казеїну і 0,05% Твін 20 (фірма Sigma), і зв'язування оцінювали за допомогою мишачого антитіла до тус (фірма Roche) і антимишачого антитіла, кон'югованого з HRP (фірма DAKO), і подальшої ферментативної реакції у присутності субстрату ТМВ (3,3', 5,5'-тетраметилбензидін) (фірма Pierce, Рокфорд, шт. Іллінойс, США) (фіг. 6). у якості позитивного контролю у всіх випадках використовували серійні розведення VEGFR2. Значення EC50 узагальнені у таблиці 11.

Таблиця 11: Значення EC₅₀ (пМ), які характеризують зв'язування одновалентних VHH з рекомбінантним людським VEGF121, встановлені за допомогою ELISA

VHH ID	EC ₅₀ (пМ)
VEGFBII23B04	510
VEGFBII24C04	792
VEGFBII23A06	928

5.8 Зв'язування з представниками сімейства VEGF VEGFB, VEGFC, VEGFD і PIGF

Зв'язування з VEGFB, VEGFC, VEGFD і PIGF визначали за допомогою ELISA, призначеного для оцінки зв'язування на твердій фазі. у цілому, метод полягав у наступному: VEGFB, VEGFC, VEGFD і PIGF (фірма R & D Systems, Міннеаполіс, шт. Міннесота, США) (1 мкг / мл) застосовували для сенсibiliзації протягом ночі при 4 ° С 96-лункового планшета MaxiSorp (фірма Nunc, Вісбаден, Німеччина). Лунки блокували розчином казеїну (1% у 3ФР). VHH вносили у вигляді серійних розведень (діапазон концентрацій: 500нМ-32пМ) і зв'язування оцінювали за допомогою мишачого антитіла до тус (фірма Roche) і антимишачого антитіла, кон'югованого з AP (фірма Sigma, Сент-Луїс, шт. Міссурі, США). У якості позитивних контролів паралельно використовували серійні розведення відповідних рецепторів і для виявлення застосовували кон'юговане з пероксидазою із хрому (HRP) козяче антитіло до людського IgG, Fc-специфічне (фірма Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Вест-Гров, шт. Пенсільванія, США), і наступну ферментативну реакцію у присутності субстрату ТМВ (3,3', 5,5'-тетраметилбензидін) (Pierce, Рокфорд, шт. Іллінойс, США). Криві дозової залежності для VHH і контролів представлені на Фіг. 7. Результати свідчать про відсутність виявляемого зв'язування вибраних VHH з VEGFB, VEGFC, VEGFD або PIGF.

5.9 Групування епітопів

Засновані на Biacore-аналізі експерименти по групуванню епітопів здійснювали з метою вирішення питання про те, які зв'язуючі VEGF агенти зв'язуються з епітопами, які є подібними чи перекривними з епітопами VEGFBII23B04. Для цієї мети VEGFBII23B04 імобілізували на сенсорному чіпі CM5. Для кожного зразка людський VEGF165 пропускали по поверхні чіпа і оборотно імобілізували за допомогою VEGFBII23B04. Потім очищені VHH (100нм) або периплазматичні екстракти (розведення 1/10) ін'єктували так, щоб час контакту з поверхнею становив 240 с при швидкості потоку 10 мкл / хв. Між експериментами з використанням різних зразків поверхню регенерували за допомогою буфера для регенерації (100мм HCl). Оброблені криві оцінювали з використанням програмного забезпечення Biacore T100. Встановлено, що VHH можна розділити на дві групи: перша група, для якої характерно додаткове зв'язування з «захопленням» за допомогою VEGFBII23B04 VEGF165, і друга група, для якої не виявлена здатність одночасно зв'язуватися з «захопленням» за допомогою VEGFBII23B04 VEGF165. У таблиці 12-A узагальнені дані про групування епітопів оцінених VHH.

Такий же аналіз застосовували для вирішення питання про те, чи можуть VEGFR1, VEGFR2, ранібізумаб і бевацизумаб зв'язуватися з людським VEGF-165 одночасно з VEGFBII23B04. У таблиці 12-Б представлені дані про додаткове зв'язування з «захопленням» за допомогою VEGFBII23B04 VEGF165. Тільки VEGFR2 не мав здатності зв'язуватися з «захопленням» за допомогою VEGFBII23B04 VEGF165, що підкреслює блокуючу дію VEGFBII23B04 щодо взаємодії VEGF-VEGFR2. Крім того, зазначені дані демонструють, що VEGFBII23B04 епітоп що розпізнається не відповідає епітопу, який розпізнається бевацизумабом і ранібізумабом.

Таблиця 12-A: групування епітопів анти-VEGF VHH - одночасне зв'язування з VEGFBII23B04

Додаткове зв'язування відсутнє або має місце низьке додаткове зв'язування з «захопленим» за допомогою 23B04 VEGF165*	1C02 1E07 4B08 8E07 8F07 12A07 12B01 86C11 86F11 86G08 86G10 86G11 87B07 88A01 88A02 88B02 88E02 88G03 88G05 88G11 88H01 89B04 89D04 89F09 89G09 89H08 24C04 23A6 27G07 23B04
Має місце додаткове зв'язування з «захопленим» за допомогою 23B04 VEGF165	3D12 5B02 5B03 5B05 6G02 7D08 8D09 8F06 10C07 10E07 10G04 10G05 11C08 11D09 11E04 11E05 11F12 86H09 41C05

* свідчить про наявність таких же або епітопів що перекриваються

Таблиця 12-Б: групування епітопів VEGFBII23B04 - зв'язування еталонних (benchmark) інгібіторів або когнатних рецепторів з «захопленим» за допомогою VEGFBII23B04 VEGF165

5

Стадія ін'єкції	Зв'язуючий агент	Концентрація зразка	Рівень зв'язування (RU)
1	VEGF165	100нМ	1727
2	VEGFBII23B04	100нМ	-
3	ранібізумаб	100нМ	763
4	бевацизумаб	100нМ	1349
5	VEGFR1	100нМ	1011
6	VEGFR2	100нМ	-

5.10 Характеризація анти-VEGF VHH за допомогою аналізу проліферації клітин HUVEC

Ефективність відібраних VHH оцінювали за допомогою аналізу проліферації. у цілому, метод полягав у наступному: перш за все HUVEC-клітини (фірма Technoclone) вирощували у мінімальному середовищі протягом ночі і потім висівали у чотирьох повторностях по 4000 клітин / лунку у 96-лункові планшети для культури тканини. Клітини стимулювали протягом 5 хв за допомогою 33 нг / мл VEGF у відсутності або у присутності VHH. Рівні проліферації вимірювали по включенню [³H]- тимідину у день 4. Результати аналізу проліферації HUVEC, представлені у таблиці.

10

15

Таблиця 13: Значення IC₅₀ (нМ) і% інгібування для одновалентних VEGFBII23B04, VEGFBII23A06 і VEGFBII24C04, встановлені у аналізі індукованої VEGF проліферації клітин HUVEC

VHH ID	IC ₅₀ (нМ)	% інгібування
VEGFBII23B04	0,36	91
бевацизумаб	0,21	92

VHH ID	IC ₅₀ (нМ)	% інгібування
VEGFBII23A06	4,29	73
VEGFBII24C04	3,8	79
бевацизумаб	0,78	78

20

5.11 Характеризація анти-VEGF VHH за допомогою аналізу фосфорилування Erk у клітинах HUVEC

Ефективність відібраних VHH оцінювали за допомогою аналізу фосфорилування Erk у клітинах HUVEC. у цілому, метод полягав у наступному: перш за все HUVEC-клітини вирощували у мінімальному середовищі протягом ночі, потім стимулювали за допомогою 10 нг / мл VEGF протягом 5 хв у відсутності або у присутності VHH. Клітини фіксували 4% формальдегіду у 3ФР та рівні фосфорилування ERK оцінювали за допомогою ELISA, використовуючи специфічні для фосфоERK антитіла (антитіло до фосфоMAP-кінази pERK1 / 2, M8159, фірма Sigma) і поліклональне кроляче антитіло до мишачого імуноглобуліну,

25

кон'юговане з HRP (PO161, фірма Dako). Як видно з таблиці 14, VEGFBII23B4 і бевацизумаб інгібували індуковане VEGF фосфорилування Erk щонайменше на 90%, що характеризувалося значеннями $IC_{50} < 1 \text{ нМ}$.

Таблиця 4: Значення IC_{50} (нМ) та% інгібування для одновалентних VEGFBII23B04, отримані у аналізі індукованого VEGF фосфорилування Erk у клітинах HUVEC

VHH ID	IC_{50} (нМ)	% інгібування
VEGFBII23B04	0,37	90
бевацизумаб	0,63	98

Приклад 6

Створення багатовалентних блокуючих анти-VEGF VHH

VHH VEGFBII23B04 зливали генетично або з VEGFBII23B04 з отриманням гомодимерного VHH (АК-послідовності см. у таблиці 15), або з іншими VEGF-зв'язуючими VHH з отриманням гетеродимерних VHH. Для створення гетеродимерних VHH з'єднували VHH з панелі, що включає 10 унікальних VEGF-зв'язуючих VHH, через що складається з 9 або 40 Gly-Ser гнучкий лінкер у двох різних орієнтаціях щодо VEGFBII23B04 (АК-послідовності см. у таблиці 15). Гомодимерний VEGFBII23B04 (VEGFBII010) і 40 гетеродимерний двовалентних VHH експресували у клітинах *E. coli* TG1 у вигляді мічених с-тис, His6 білків. Експресію індукували шляхом додавання 1мМ ІПТГ і давали тривати протягом 4 год при 37 ° С. Після центрифугування клітинних культур отримували периплазматичні екстракти шляхом заморожування-відтавання дебриса. Ці екстракти застосовували у якості вихідного матеріалу та VHH очищали за допомогою IMAx і знесолюючих до досягнення чистоти 90% за даними ДСН-ПААГ.

Таблиця 15: ID послідовностей, ID VHH і АК-послідовності двовалентних анти VEGF VHH (кожен із застосовуваних лінкерів виділений кольором у одній з відповідних послідовностей)

ID послідовностей/ SEQ ID NO:	ID VHH	АК послідовності
VEGFBII23B04-35GS- 23B04/128	VEGFBII010	EVQLVESGGGLVQGTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DIAKNTVYLLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGG GGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQGTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFV AISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDIAKNTVYLLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGT QVTVSS
VEGFBII23B04-9GS- 4B08/129		EVQLVESGGGLVQGTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DIAKNTVYLLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGSAVDITVAWYRQAPGIQRLVATITPSGYTYWDFVKGRTISRDNKNI VYLLQINSLKPEDTAAAYCNCQFYWGQGTQVTVSS
VEGFBII23B04-9GS- 5B03/130		EVQLVESGGGLVQGTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DIAKNTVYLLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGSAVDITVAWYRQAPGIQRLVATITPSGYTYWDFVKGRTISRDNKNI NTVYLLQINSLKPEDTAVYYCAATAFYRGPYDYDWGQGTQVTVSS
VEGFBII23B04-9GS- 5B05/131	VEGFBII022	EVQLVESGGGLVQGTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DIAKNTVYLLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGIRFMSMAWYRQAPGKRELVARISSGGGTAYVDSVKGRTISRDNKNTV YLLQINSLKPEDTAVYYCNCQFYWGQGTQVTVSS
VEGFBII23B04-9GS- 6G02/132		EVQLVESGGGLVQGTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DIAKNTVYLLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGIRFMSMAWYRQAPGKRELVARISSGGGTAYVDSVKGRTISRDNKNTV NTVYLLQINSLKPEDTAVYYCAATAFYRGPYDYDWGQGTQVTVSS
VEGFBII23B04-9GS- 10E07/133		EVQLVESGGGLVQGTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DIAKNTVYLLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYAMGWFRQAPGKRELVARISSGGGTAYVDSVKGRTISRDNKNTV NTVYLLQINSLKPEDTAVYYCAASAWWYSQMDARDNYRYWGQGTQVTVSS
VEGFBII23B04-9GS- 12B01/134		EVQLVESGGGLVQGTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DIAKNTVYLLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSNYAMGWFRQAPGKRELVARISSGGGTAYVDSVKGRTISRDNKNTV NTVYLLQINSLKPEDTALYSCAKGGAPNYTPRGRGTQVTVSS
VEGFBII23B04-9GS- 86C11/135		EVQLVESGGGLVQGTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DIAKNTVYLLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQAGDSLRSLCTASGRTFNSYAMGWFRQAPGKERESVAHINRSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTV NTVYLLQINSLKPEDTAVYYCAAGRYYSDDGVPASFNWYGQGTQVTVSS

ID послідовностей/ SEQ ID NO:	ID VHH	AK послідовності
VEGFBII23B04-9GS-86H09/136		EVQLVESGGGLVQTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQAGGSLRLSCTASGSFAKSYRMGWFRRTPGKEDEFVASISWTYGSFTFYADSVKGRFTISRDN KNAGYLQMNLSLKPEDTALYYCAAGAQSADRYNIRSYDYWGQGTQVTVSS
VEGFBII23B04-9GS-87B07/137		EVQLVESGGGLVQTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTSWMHVWRQAPGKLEWVSSIPPVGHFANYAPSVKGRFTISRDN NTLFLQMNLSLKSEDTAVYYCAKDSAGRTKGQGTQVTVSS
VEGFBII23B04-9GS-88A01/138		EVQLVESGGGLVQTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFSNYAMDWFRQAPGKEREFVVAITRSGGGTYADSVKGRFTISRDN NTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAATRSSTIVGVGGMEYWGKGTQVTVSS
VEGFBII23B04-40GS-4B08/139		EVQLVESGGGLVQTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSGGGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSAVGDITVAWYRQAPGIQ RQLVATITPSGYTYWDFVKGRTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAAYYCNTQFYWGQGTQVTVSS
VEGFBII23B04-40GS-5B03/140		EVQLVESGGGLVQTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSGGGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLAQAGDSLRLSCAASGRFSHYNMGWFRQAPGK EREFVASIRGGGTTIYANSVKDRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAATAFYRGPYDYDWG QGTQVTVSS
VEGFBII23B04-40GS-5B05/141	VEGFBII021	EVQLVESGGGLVQTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSGGGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFSHYNMGWFRQAPGK ELVARISSGGTTAYVDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNTFSSRPNPWGAGTQVTVSS
VEGFBII23B04-40GS-6G02/142		EVQLVESGGGLVQTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSGGGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFSHYNMGWFRQAPGK QRELVARISSGGFTYYLDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNAAYRTYNYWGQGTQ VTVSS
VEGFBII23B04-40GS-10E07/143	VEGFBII023	EVQLVESGGGLVQTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSGGGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFSNYAMGWFRQAPGK ERVLVADISSGINTYVADAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAASAWWYSQMARDNY RYWGQGTQVTVSS
ID послідовностей/ SEQ ID NO:	ID VHH	AK послідовності
VEGFBII23B04-40GS-12B01/144		EVQLVESGGGLVQTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSGGGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLACASGFTLSSWYMWVRQAPGK GLEWVSRISSPGGLFTYYVDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTALYYCAAGGAPNYTPRGRTQV TVSS
VEGFBII23B04-40GS-86C11/145		EVQLVESGGGLVQTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSGGGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCTASGRTFNSYAMGWFRQAPGK ERESVAHINRSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQINSLKPEDTALYYCAAGGAPNYTPRGRTQV TVSS
VEGFBII23B04-40GS-86H09/146	VEGFBII024	EVQLVESGGGLVQTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSGGGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGSAFYSYRMGWFRRTPGK EDEFVASISWTYGSFTFYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQINSLKPEDTALYYCAAGAQSADRYNIRSYDY WGQGTQVTVSS
VEGFBII23B04-40GS-87B07/147		EVQLVESGGGLVQTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSGGGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTSWMHVWRQAPGK GLEWVSSIPPVGHFANYAPSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNLSLKSEDTAVYYCAKDSAGRTKGQGTQVTV SS
VEGFBII23B04-40GS-88A01/148		EVQLVESGGGLVQTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISK DNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSGGGGS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFSNYAMDWFRQAPGK EREFVVAITRSGGGTYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAATRSSTIVGVGGMEY WGKGTQVTVSS
VEGFBII4B08-9GS-23B04/149		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSAVGDITVAWYRQAPGIQRLVATITPSGYTYWDFVKGRTISR DNSKNIVYLQMNLSLKPEDTAAYYCNTQFYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQTGDSLR SCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTA VYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS
VEGFBII5B03-9GS-23B04/150		EVQLVESGGGLAQAGDSLRLSCAASGRFSHYNMGWFRQAPGKEREFVVAIRGGGTTIYANSVKDRFTI SRENAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAATAFYRGPYDYDWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESG GGLVQTGDSLRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTV YLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS
VEGFBII5B05-9GS-23B04/151		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAGSIRFMSMAWYRQAPGKHRELVARISSGGTTAYVDSVKGRFTISR NSKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNTFSSRPNPWGAGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQTGDS LRSLCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLEGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKE DTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS

ID послідовностей/ SEQ ID NO:	ID VHH	AK послідовності
VEGFBII6G02-9GS- 23B04/152		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFSSNYAMGWFRQAPGKQRELVARISGGGFTYYLDSVKGRFTV SRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAAYRTYNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLV QTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLGRFTISKDNAKNTVYLQIN SLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS
VEGFBII10E07-9GS- 23B04/153		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYAMGWFRQAPGKERVLVADISSGINTYVADAVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAASAWWYSQMARDNYRYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLGRFTISKDNA KNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS
VEGFBII12B01-9GS- 23B04/154		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSSWMYWVRQAPGKGLEWVSRISSPGGLFTYYVDSVKGRFS VSTDNANTLYLQMNLSLKPEDTALYSCAKGGAPNYTPRGRGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLV QTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLGRFTISKDNAKNTVYLQIN SLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS
VEGFBII86C11-9GS- 23B04/155		EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCTASGRTFSNYAMGWFRQAPGKERESVAHINRSGSSTYYADSVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAAGRYSSDGVPSAFNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLGRFTISKDNA KNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS
VEGFBII86H09-9GS- 23B04/156		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGSAFYSYRMGWFRRTPGKEDEFVASISWTYGSTFYADSVKGRFTM SRDKAKNAGYLQMNLSLKPEDTALYYCAAGAQSDRYNIRSYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLGRFTISKDNAK NTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS
VEGFBII87B07-9GS- 23B04/157		EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCASGFTFSTSWMHVVRQAPGKGLEWVSIPPVGHFANYAPSVKGRFTI SRDNAKNTLFLQMNLSLKSEDVAVYYCAKDSAGRTKGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQT GDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLGRFTISKDNAKNTVYLQINSL KPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS
VEGFBII88A01-9GS- 23B04/158		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFSNYAMDWFRQAPGKEREFVAITRSGGGTTYADSVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAATRSSTIVVGGMMEYWGKGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLV ESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYKYDSVSLGRFTISKDNAK NTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS
VEGFBII4B08-40GS- 23B04/159		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSAVDITVAWYRQAPGIQRLVATITPSGYTYWDFVKGRFTISR DNSKNIVYLQMNLSLKPEDTAAAYCNTQFYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGGGSGGGGGSGGG SGGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISKGGYK YDSVSLGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTVSS
ID послідовностей/ SEQ ID NO:	ID VHH	AK послідовності
VEGFBII5B03-40GS- 23B04/160		EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSHYNMGWFRQAPGKEREFVASIRGGGGSTTYANSVKDRFTI SRENAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAATAFYRGPYDYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGG GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKER EFVVAISKGGYKYDSVSLGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEY WGQGTQVTVSS
VEGFBII5B05-40GS- 23B04/161		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGIRFMSMAWYRQAPGKHRELVARISGGTTAYVDSVKGRFTISR NSKNTVYLQMNLSLKAEPTAVYYCNTFSSRPNPWGAGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISK GKYKYDSVSLGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTV SS
VEGFBII6G02-40GS- 23B04/162		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFSSNYAMGWFRQAPGKQRELVARISGGGFTYYLDSVKGRFTV SRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAAYRTYNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFV VAISKGGYKYDSVSLGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGT QVTVSS
VEGFBII10E07-40GS- 23B04/163	VEGFBII025	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYAMGWFRQAPGKERVLVADISSGINTYVADAVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAASAWWYSQMARDNYRYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGG GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQ GKEREFVVAISKGGYKYDSVSLGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTY EYWGQGTQVTVSS
VEGFBII12B01-40GS- 23B04/164		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSSWMYWVRQAPGKGLEWVSRISSPGGLFTYYVDSVKGRFS VSTDNANTLYLQMNLSLKPEDTALYSCAKGGAPNYTPRGRGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFV VAISKGGYKYDSVSLGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGT QVTVSS
VEGFBII86C11-40GS- 23B04/165		EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCTASGRTFSNYAMGWFRQAPGKERESVAHINRSGSSTYYADSVKGRFTI SRDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCAAGRYSSDGVPSAFNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQG KEREFVVAISKGGYKYDSVSLGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYE YWGQGTQVTVSS
VEGFBII86H09-40GS- 23B04/166		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGSAFYSYRMGWFRRTPGKEDEFVASISWTYGSTFYADSVKGRFTM SRDKAKNAGYLQMNLSLKPEDTALYYCAAGAQSDRYNIRSYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFV VAISKGGYKYDSVSLGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEY WGQGTQVTVSS
ID послідовностей/ SEQ ID NO:	ID VHH	AK послідовності
VEGFBII87B07-40GS- 23B04/167		EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCASGFTFSTSWMHVVRQAPGKGLEWVSIPPVGHFANYAPSVKGRFTI SRDNAKNTLFLQMNLSLKSEDVAVYYCAKDSAGRTKGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGKEREFVVAISK GGYKYDSVSLGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTQVTV SS
VEGFBII88A01-40GS- 23B04/168		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFSNYAMDWFRQAPGKEREFVAITRSGGGTTYADSVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAATRSSTIVVGGMMEYWGKGTQVTVSSGGGGSGGGSGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCEVSGRTFSSYSMGWFRQAQGK EREFVVAISKGGYKYDSVSLGRFTISKDNAKNTVYLQINSLKPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEY WGQGTQVTVSS

5 Панель з 40 двовалентних VHH тестували щодо здатності блокувати VEGFR2 і VEGFR1 за допомогою AlphaScreen-аналізу, описаного у прикладах 5.3 і 5.4 відповідно. На основі ефективності та максимального рівня інгібування вибирали п'ять найперспективніших двовалентних VHH (VEGFBII021, VEGFBII022, VEGFBII023, VEGFBII024 і VEGFBII025) для додаткової характеристики. Огляд результатів скринінгу п'яти відібраних двовалентних VHH,

проведеного за допомогою конкурентного AlphaScreen-аналізу щодо VEGFR2 і VEGFR1, представлений у таблиці 16.

Таблиця 16: Сила і ефективність п'яти відібраних двовалентних VHH щодо взаємодії: VEGF/VEGFR1 і VEGF/VEGFR2, встановлені за допомогою конкурентного AlphaScreen-аналізу

VHH ID	VEGFR2		VEGFR1	
	IC ₅₀ (пМ)	IC ₅₀ (пМ)	% інгібування	
VEGFBII021	9	16	100	
VEGFBII022	7	8	100	
VEGFBII023	38	44	91	
VEGFBII024	12	46	100	
VEGFBII025	51	39	82	

Приклад 7

Характеризація форматуваних анти-VEGF VHH

VHH VEGFBII010, VEGFBII021, VEGFBII022, VEGFBII023, VEGFBII024 і VEGFBII025 порівнювали у паралельних дослідах щодо блокування VEGFR2 і VEGFR1 за допомогою ELISA (фіг. 8 і 9, таблиця 17 і таблиця 18 відповідно) і AlphaScreen-аналізу (фіг. 10 і 11, таблиця 19 і 20) згідно методів, описаним у прикладах 5.1, 5.2, 5.3 та 5.4 відповідно.

Таблиця 17: Значення IC₅₀ (пМ) і % інгібування для форматуваних VHH, встановлені за допомогою конкурентного ELISA, які характеризують здатність інгібувати взаємодію: hVEGF165/hVEGFR2-Fc

VHH ID	IC ₅₀ (пМ)	% інгібування
VEGFBII010	49	100
VEGFBII021	204	100
VEGFBII022	164	100
VEGFBII023	213	100
VEGFBII024	292	100
VEGFBII025	577	100
бевацизумаб	315	100
ранібізумаб	349	100

Таблиця 18: Значення IC₅₀ (пМ) та% інгібування для форматуваних VHH, встановлені за допомогою конкурентного ELISA, які характеризують здатність інгібувати взаємодію hVEGF165/hVEGFR1-Fc

VHH ID	IC ₅₀ (пМ)	% інгібування
VEGFBII010	73,5	67
VEGFBII021	254	97
VEGFBII022	225	89
VEGFBII023	279	91
VEGFBII024	326	92
VEGFBII025	735	91
бевацизумаб	484	91
ранібізумаб	594	96

Таблиця 19: Значення IC₅₀ (пМ) та% інгібування для форматуваних VHH, встановлені за допомогою конкурентного AlphaScreen-аналізу, які характеризують здатність інгібувати взаємодію: hVEGF165/hVEGFR2-Fc

VHH ID	IC ₅₀ (пМ)	% інгібування
VEGFBII010	16	100
VEGFBII021	7	100
VEGFBII022	7	100
VEGFBII023	46	100
VEGFBII024	50	100
VEGFBII025	51	100
ранібізумаб	600	100

Таблиця 20: Значення IC₅₀ (пМ) та% інгібування для форматуваних VHH, встановлені за

допомогою конкурентного AlphaScreen-аналізу, які характеризують здатність інгібувати взаємодію: hVEGF165/hVEGFR1-Fc

VHH ID	IC ₅₀ (пМ)	% інгібування
VEGFBII010	21	70
VEGFBII021	12	100
VEGFBII022	9	98
VEGFBII023	48	87
VEGFBII024	69	98
VEGFBII025	71	82
ранібізумаб	1300	87

- 5 Крім того, оцінювали здатність форматуваних VHH блокувати взаємодію mVEGF164/mVEGFR2-huFc. у цілому, метод полягав у наступному; серійні розведення очищених VHH (діапазон концентрацій: 4мкМ-14, 5пМ) у ЗФР-буфері, що містить 0,03% Твін 20 (фірма Sigma), додавали до 0,1 нМ біотинілювання mVEGF164 і інкубували протягом 15 хв. Потім додавали комплекс мишачий VEGFR2-huFc (0,1 нМ) і сенсibiliзовані анти-huFc VHH
- 10 акцепторні гранули (20 мкг/мл) і зазначену суміш інкубували протягом 1 год. І, нарешті, додавали вкриті стрептавідином донорські гранули (20 мкг / мл) і після інкубації протягом 1 год оцінювали флуоресценцію за допомогою рідера для мікропланшетів типу Envision. Криві дозової залежності представлені на Фіг. 12. Дані про значення IC₅₀, які характеризують здатність VHH блокувати взаємодію мишачий VEGF164/VEGFR2-huFc, узагальнені у таблиці
- 15 21.

Таблиця 21: Значення IC₅₀ (пМ) та% інгібування для форматуваних анти-VEGF VHH, встановлених за допомогою конкурентного AlphaScreen-аналізу, які характеризують здатність інгібувати взаємодію mVEGF164/mVEGFR2-hFc

VHH ID	IC ₅₀ (пМ)	% інгібування
VEGFBII022	108	100
VEGFBII024	-	-
mVEGF164	0,05	100
ранібізумаб	-	-

- 20 Оцінювали також за допомогою ELISA здатність форматуваних VHH зв'язуватися з mVEGF164 і rhVEGF165 (приклад 5.6; Фіг.13; таблиця 22), VEGF121 (приклад 5.7; фіг. 15; таблиця 23) і з представниками сімейства VEGF VEGFB, VEGFC, VEGFD і PIGF (приклад 5.8; фіг. 14). Кінетичні характеристики зв'язування з людським VEGF165 аналізували згідно з методом, викладеному у прикладі 5.5. величини K_D представлені у таблиці 24.
- 25

Таблиця 22: Значення EC₅₀ (пМ) для форматуваних VHH, які характеризують зв'язування з рекомбінантним людським VEGF165 і мишачим VEGF164, встановлених за допомогою ELISA

	rhVEGF165	rmVEGF164
VHH ID	EC ₅₀ (пМ)	EC ₅₀ (пМ)
VEGFBII010	428	-
VEGFBII021	334	502
VEGFBII022	224	464
VEGFBII023	221	-
VEGFBII024	320	-
VEGFBII025	668	-

- 30 Таблиця 23: Значення EC₅₀ (пМ) для форматуваних VHH, які характеризують зв'язування з рекомбінантним людським VEGF121, встановлені за допомогою ELISA

	rhVEGF121
VHH ID	EC ₅₀ (пМ)
VEGFBII010	920
VEGFBII022	540
VEGFBII024	325
VEGFBII025	475

Таблиця 24: Афіністність K_D (нМ) очищених форматуваних VHH до рекомбінантного людського VEGF165

VHH ID	k_{a1} (1/Mc)	k_{d1} (1/c)	k_{a2} (1/c)	k_{d2} (1/c)	K_D (нМ) ^(a)
VEGFBII010 ^(b)	4,5E+05	1,7E-02	2,9E-02	1,3E-04	0,16
VEGFBII021 ^(b)	1,2E+06	1,1E-02	2,3E-02	1,9E-04	0,07
VEGFBII022 ^(b)	1,2E+06	9,1E-03	1,4E-02	2,6E-04	0,14
VEGFBII023 ^(b)	3,0E+05	1,8E-02	2,4E-02	2,7E-04	0,69
VEGFBII024 ^(b)	3,0E+05	1,3E-02	2,6E-02	2,8E-04	0,47
VEGFBII025 ^(b)	3,3E+05	1,7E-02	1,8E-02	3,7E-04	1,1

(a) $K_D = k_{d1}/k_{a1} \cdot (k_{d2}/(k_{d2}+k_{a2}))$

(b) апроксимацію кривих здійснювали на основі моделі реакції з двома станами з використанням програмного забезпечення Biacore T100 Evaluation v2.0.1.

5

VHH VEGFBII010, VEGFBII022, VEGFBII024 і VEGFBII025 оцінювали також щодо опосередковуваної VEGF проліферації клітин HUVEC і фосфорилування Erk.

Ефективність відібраних форматуваних VHH оцінювали за допомогою аналізу проліферації. у цілому, метод полягав у наступному: первинні клітини HUVEC (фірма Technoclone) вирощували у мінімальному середовищі протягом ночі і потім по 4000 клітин / лунку висівали у чотирьох повторностях у 96-лункові планшети для культури тканини. Клітини стимулювали з використанням 33 нг / мл VEGF у відсутності або у присутності VHH. Рівні проліферації вимірювали по включенню [³H]-тимідину у день 4. Результати, представлені у таблиці 25, продемонстрували, що форматувані VHH і бевацизумаб інгібували індуквану VEGF проліферацію HUVEC більш ніж на 90%, при цьому значення IC_{50} становили <1нМ.

Таблиця 25: Значення IC_{50} (нМ) та% інгібування для форматуваних VHH, встановлені за допомогою аналізу індукованої VEGF проліферації клітин HUVEC

VHH ID	IC_{50} (нМ)	% інгібування
VEGFBII010	0,22	95
VEGFBII021	0,40	98
VEGFBII022	0,34	100
VEGFBII023	0,52	98
VEGFBII024	0,38	96
VEGFBII025	0,41	104
бевацизумаб	0,21	92

Ефективність відібраних форматуваних VHH оцінювали також за допомогою аналізу фосфорилування Erk у клітинах HUVEC. у цілому, метод полягав у наступному: первинні HUVEC-клітини вирощували у мінімальному середовищі протягом ночі, потім стимулювали за допомогою 10 нг / мл VEGF протягом 5 хв у відсутності або у присутності VHH. Клітини фіксували 4% формальдегіду у 3ФР та рівні фосфорилування ERK оцінювали за допомогою ELISA, використовуючи специфічні для фосфоERK антитіла (антитіло до фосфоMAP-кінази pERK1 & 2, M8159, фірма Sigma) і поліклональне кроляче антитіло до мишачого імуноглобуліну, кон'юговане з HRP (PO161, фірма Dako). Як видно з таблиці 26, форматувані VHH і бевацизумаб інгібували індукване VEGF фосфорилування Erk більш ніж на 90%, що характеризувалося значеннями IC_{50} <1нМ.

Таблиця 26: Значення IC_{50} (нМ) та% інгібування для форматуваних VHH, встановлені при аналізі індукваного VEGF фосфорилування Erk у клітинах HUVEC

VHH ID	IC ₅₀ (нМ)	% інгібування
VEGFBII010	0,19	92
VEGFBII021	0,21	103
VEGFBII022	0,18	94
VEGFBII023	0,25	100
VEGFBII024	0,23	94
VEGFBII025	0,23	99
бевацизумаб	0,63	98

Приклад 8

Оптимізація послідовностей

5 8.1 Оптимізація послідовності VEGFBII23B04

Здійснювали порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей VEGFBII23B04 і послідовності людської зародкової лінії VH3-23/JH5, див. фіг. 16 (SEQ ID NO: 179).

Порівняльний аналіз продемонстрував, що VEGFBII23B04 містить 19 мутацій у каркасних ділянках відносно референс-послідовності зародкової лінії. Нелюдські залишки у положеннях 14, 16, 23, 24, 41, 71, 82, 83 і 108 відбирали для заміни на їх копії з людської зародкової лінії. Створювали набір, що включає 8 варіантів VEGFBII23B04, які несуть різні комбінації людських залишків у цих положеннях (АК-послідовності представлені у таблиці 27). Конструювали один додатковий варіант, у якому видаляли потенційний сайт ізомеризації у положенні D59S60 (CDR2-ділянку, див. фіг. 16, залишки позначені виділенням жирним шрифтом курсивом) шляхом інтродукції мутації S60A.

Таблиця 27: АК- послідовність варіантів VHH VEGFBII23B04 з оптимізованою послідовністю (FR, каркасну ділянку; CDR, гіперваріабельну ділянку)

ID VHH/ SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBII 111D05/47	EVQLVESGGGL VQTGGSLRLSC EASGRIFS	SYSMG	WFRQAPGKEREFV V	AISKGGYK YDSVSLEG	RFTISRDNAKNTVYLQINS LRPETA VYYCAS	SRAYGSSR LRLADTYE Y	WGQGTILVTVS S
VEGFBII 111G06/48	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGRIFS	SYSMG	WFRQAPGKEREFV V	AISKGGYK YDSVSLEG	RFTISRDNAKNTVYLQMN SLRPETA VYYCAS	SRAYGSSR LRLADTYE Y	WGQGTILVTVS S
VEGFBII 112D11/49	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC EASGRIFS	SYSMG	WFRQAPGKEREFV V	AISKGGYK YDSVSLEG	RFTISRDNAKNTVYLQINS LRPETA VYYCAS	SRAYGSSR LRLADTYE Y	WGQGTILVTVS S
VEGFBII 113A08/50	EVQLVESGGGL VQTGGSLRLSC EVSGRIFS	SYSMG	WFRQAPGKEREFV V	AISKGGYK YDSVSLEG	RFTISKDNAKNTVYLQINS LRPETA VYYCAS	SRAYGSSR LRLADTYE Y	WGQGTILVTVS S
VEGFBII 113E03/51	EVQLVESGGGL VQTGDSLRLSC EVSGRIFS	SYSMG	WFRQAQGKEREFV V	AISKGGYK YDSVSLEG	RFTISKDNAKNTVYLQMN SLRPETA VYYCAS	SRAYGSSR LRLADTYE Y	WGQGTILVTVS S
VEGFBII 114C09/52	EVQLVESGGGL VQTGDSLRLSC EVSGRIFS	SYSMG	WFRQAPGKEREFV V	AISKGGYK YDSVSLEG	RFTISKDNAKNTVYLQINS LRPETA VYYCAS	SRAYGSSR LRLADTYE Y	WGQGTILVTVS S
VEGFBII 114D02/53	EVQLVESGGGL VQTGGSLRLSC EVSGRIFS	SYSMG	WFRQAPGKEREFV V	AISKGGYK YDSVSLEG	RFTISRDNAKNTVYLQINS LRPETA VYYCAS	SRAYGSSR LRLADTYE Y	WGQGTILVTVS S
VEGFBII 114D03/54	EVQLVESGGGL VQTGDSLRLSC AVSGRIFS	SYSMG	WFRQAQGKEREFV V	AISKGGYK YDSVSLEG	RFTISKDNAKNTVYLQINS LRPETA VYYCAS	SRAYGSSR LRLADTYE Y	WGQGTILVTVS S
VEGFBII 118E10/55	EVQLVESGGGL VQTGDSLRLSC EVSGRIFS	SYSMG	WFRQAQGKEREFV V	AISKGGYK YDAVSLEG	RFTISKDNAKNTVYLQINS LKPETA VYYCAS	SRAYGSSR LRLADTYE Y	WGQGTQVTVS S

Ці варіанти характеризували у вигляді очищених білків відносно взаємодії VEGF165/VEGFR2 за допомогою AlphaScreen-аналізу (приклад 5.3, фіг. 17). Визначали температуру плавлення (Т_{пл}) для кожного клону за допомогою аналізу термального зсуву, який заснований на оцінці збільшення сигналу флуоресценції при включенні реагенту Sypro Orange (фірма Invitrogen) (Ericsson та ін., Anal. Biochem. 357, 2006, сс. 289-298). Для всіх варіантів характерні порівнянні значення IC₅₀ у порівнянні з VEGFBII23B04, і значення Т_{пл}, перевищують або близькі до значень Т_{пл} для батьківського клону VEGFBII23B04. у таблиці 28 узагальненні дані про значення IC₅₀ вивчених 9 клонів і значеннях Т_{пл} при pH 7.

Таблиця 28: Значення IC₅₀ (пМ), % інгібування і температура плавлення (pH 7) для варіантів з оптимізованою послідовністю VEGFBII23B04

VHH ID	IC ₅₀ (nM)	% інгібування	T _{пл} , pH 7 (°C)
VEGFBII23B04 (wt)	169	100	63
VEGFBII111D05	209	100	68
VEGFBII111G06	366	100	71
VEGFBII112D11	221	100	70
VEGFBII113A08	253	100	69
VEGFBII113E03	290	100	68
VEGFBII114C09	215	100	71
VEGFBII114D02	199	100	74
VEGFBII114D03	227	100	64
VEGFBII118E10	189	100	62

У другому циклі об'єднували прийнятні мутації, отримані у процесі гуманізації (VEGFBII111G06), і мутації, що дозволяють уникати можливої пост-трансляційної модифікації вибраних сайтів (D16G, заміна S60A і мутація E1D), отримуючи клон з оптимізованою послідовністю, виведений з VEGFBII23B04, а саме, VEGFBII0037. Спеціально був створений один варіант з оптимізованою послідовністю (VEGFBII038), який містив всі заміни, зазначені для VEGFBII0037, за винятком мутації I82M, оскільки ця мутація може бути асоційована з невеликим зниженням ефективності. Послідовності обох клонів з оптимізованими послідовностями представлені у таблиці 29. VEGFBII0037 і VEGFBII038 характеризували щодо блокади взаємодії VEGF165/VEGFR2 за допомогою AlphaScreen-аналізу (приклад 5.3, фіг. 18), температуру плавлення визначали за допомогою описаного вище аналізу термального зсуву, а афінність зв'язування з VEGF165 визначали за допомогою Біосере-аналізу (приклад 5.5). Узагальнення характеристик двох VHH з оптимізованими послідовностями представлено у таблиці 30.

Таблиця 29: АК- послідовності варіантів з оптимізованою послідовністю VHH VEGFBII23B04

VHH ID/ SEQ ID NO:	FR 1	CDR 1	FR2	CDR 2	FR3	CDR 3	FR 4
VEGFBII037 56	DVQLV ESGGG LVQPG GSLRL SCAAS GRTFS	SYSMG	WFRQ APGKE REFVV	AISKGG YKYDA VSLEG	RFTISR NAKNTV YLQMNS LRPEDTA VYYCAS	SRAYGS SRLRLA DTYEY	WGQGT LVTVSS
VEGFBII038 57	DVQLV ESGGG LVQPG GSLRL SCAAS GRTFS	SYSMG	WFRQ APGKE REFVV	AISKGG YKYDA VSLEG	RFTISR NAKNTV YLQINSL RPEDTAV YYCAS	SRAYGS SRLRLA DTYEY	WGQGT LVTVSS

Таблиця 30: Значення IC₅₀ (nM), % інгібування, температура плавлення (pH 7) і афінність (nM) для клонів з оптимізованою послідовністю VEGFBII037 і VEGFBII038

VHH ID	IC ₅₀ (nM)	% інгібування	T _{пл} (°C), pH 7	K _D (nM)
VEGFBII23B04	152	100	63	560
VEGFBII037	300	100	72	270
VEGFBII038	143	100	71	360

8.2 Оптимізація послідовності VEGFBII5B05

Здійснювали вирівнювання амінокислотних послідовностей VEGFBII23B05 і послідовності людської зародкової лінії VH3-23/JH5, див. фіг. 19 (SEQ ID NO: 179). Порівняльний аналіз продемонстрував, що VEGFBII23B05 містив 15 мутацій у каркасних ділянках відносно референс-послідовності зародкової лінії. Нелюдські залишки у положеннях 23, 60, 83, 105, 108 вибирали для заміни на їх копії з людської зародкової лінії, у той час як гістидин у положенні 44 вибирали для заміни на глутамін. Створювали один гуманізований варіант, що несе 6 описаних

мутацій (AK-послідовності представлені у таблиці 31).

Таблиця 31: AK- послідовності варіантів з оптимізованою послідовністю VHH VEGFBII5B05 (FR, каркасну ділянку; CDR, гіперваріабельну ділянку)

VHH ID/ SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBII119G11/ 125	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCAASGI RFM	SMA	WYRQA PGKQRE LVA	RISSG GTTAY ADSVK G	RFTISR D NSKNTV YLQMNS LRAEDTA VYYCNT	FSSRP NP	WGQ GTLV TVSS
VEGFBII120E10/ 126	EVQLVES GGGLVQ PGGSLRL SCVASGI RFI	SMA	WYRQA PGKHRE LVA	RISSG GTTAY VDSVK G	RFTISR D NSKNTV YLQMNS LKAEDTA VYYCNT	FSSRP NP	WGA GTQV TVSS

Конструювали один додатковий варіант, у якому потенційний сайт окислення у положенні M30 (CDR1-ділянку, див. фіг. 19, залишок виділено жирним шрифтом і курсивом) видаляли шляхом інтродукції мутації M30I. Оцінювали здатність обох варіантів зв'язуватися з hVEGF165 за допомогою системи ProteOn. у цілому, метод полягав у наступному: сенсорний чіп GLC ProteOn сенсibilізованими людським VEGF165. Периплазматичні екстракти варіантів розводили у співвідношенні 1/10 та ін'єктували на чіп, сенсibilізований людським VEGF165. Розраховували швидкості реакції дисоціації і порівнювали зі швидкостями реакції дисоціації батьківського VEGFBII5B05. Швидкості реакції дисоціації двох варіантів виявилися такими ж, що і швидкості реакції дисоціації батьківського VEGFBII5B05, це свідчить про прийнятність всіх мутацій (таблиця 32).

Таблиця 32: Швидкості реакції дисоціації варіантів VEGFBII5B05 з оптимізованою послідовністю

VHH ID	Рівень зв'язування (RU)	k_d (1/c)
VEGFBII5B05	242	$6,15 \cdot 10^{-2}$
VEGFBII119G11	234	$7,75 \cdot 10^{-2}$
VEGFBII120E10	257	$4,68 \cdot 10^{-2}$

У другому циклі об'єднували мутації, отримані у процесі гуманізації, і заміну M30I, отримуючи клон з оптимізованою послідовністю, виведений з VEGFBII23B05, позначений як VEGFBII032. Послідовність представлена в таблиці 33. Афінність VEGFBII032 визначали за допомогою Віасог-аналізу (див. приклад 5.5), а температуру плавлення визначали за допомогою описаного вище аналізу термального зсуву. Узагальнення характеристик VHH VEGFBII032 з оптимізованою послідовністю представлено у таблиці 34.

Таблиця 33: AK- послідовність клону з оптимізованою послідовністю VEGFBII032 (FR, каркасна ділянка; CDR, гіперваріабельна ділянка)

VHH ID/ SEQ ID NO:	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VEGFBII032/ 127	EVQLVE SGGGLV QPGGSL RLSCAA SGIRFI	SMA	WYRQA PGKQRE LVA	RISSG GTTA YADS VKG	RFTISR D NSKNTV YLQMNS LRAEDTAVY YCNT	FSSRP NP	WGQGTL VTSS

Таблиця 34: Температура плавлення (pH 7) і афінність (нМ) клону з оптимізованою послідовністю VEGFBII032

VHH ID	T_m (°C), pH 7	K_D (нМ)
VEGFBII5B05(wt)	69	32
VEGFBII032	71	44

Ефективність клонів з оптимізованою послідовністю VEGFBII037 і VEGFBII038 оцінювали за допомогою аналізу проліферації. у цілому, метод полягав у наступному: первинні клітини HUVEC (фірма Technoclone) вирощували у мінімальному середовищі протягом ночі і потім по 4000 клітин / лунку висівали у чотирьох повторностях у 96-лункові планшети для культури тканини. Клітини стимулювали з використанням 33 нг / мл VEGF у відсутності або у присутності VHH. Рівні проліферації оцінювали по включенню [³H]-тимідину у день 4. Результати, представлені у таблиці 35, демонструють що активність (ефективність і ступінь інгібування) батьківського VHH VEGFBII23B04 повністю відповідала активності клона з оптимізованою послідовністю VEGFBII038.

Таблиця 35: Значення IC₅₀ (нМ) і % інгібування для клонів з оптимізованою послідовністю VEGFBII037 і VEGFBII038, встановлені у аналізі індукованої VEGF проліферації клітин HUVEC

VHH ID	IC ₅₀ (нМ)	% інгібування
VEGFBII23B04	0,68	92
VEGFBII037	1,54	78
VEGFBII038	0,60	92
бевацизумаб	0,29	94

Приклад 9

Конструювання, отримання та характеристика двовалентних VHH, мішенню яких є Ang2

Здійснювали генетичне злиття VHH 1D01 (SEQ ID NO: 214), 11B07, 00908 і 00027 (SEQ ID NO: 216) з 1D01 (SEQ ID NO: 214), 11B07, 00908 і 00027 (SEQ ID NO: 216) відповідно з отриманням гомодимерних VHH. Двовалентні VHH з'єднували через гнучкий лінкер 9-GlySer або 40-GlySer. Кодуючі послідовності форматуваних VHH клонували у експресійному векторі рAX172. VHH експресували у *Pichia pastoris* у вигляді білків, мічених на С-кінці за допомогою тус - His6. у цілому, метод полягав у наступному: починали створення культури BGCM з індивідуальної колонії, отриманої посівом штрихом, яку інкубували протягом вихідних днів при 30 ° С (250 об / хв). Після заміни середовища на BMCM культури інкубували до вечора при 30 ° С (250 об / хв) і здійснювали подальшу індукцію з використанням 100% метанолу. Наступного дня культури індукували ще тричі (вранці, вдень і ввечері). Наступного дня культури центрифугували протягом 20 хв при 4°C (1500×g). Мічені за допомогою His6 VHH, присутні у супернатанті, очищали за допомогою хроматографії на іммобілізованому металі (IMAX) з наступним знесоленням (DS) і, нарешті, гель-фільтрації (ГФ) для видалення будь-яких ендотоксинів / домішок. Огляд форматів і послідовностей всіх двовалентних VHH представлений на Фіг. 20 і у таблиці 36-А (лінкерні послідовності підкреслені), SEQ ID NO: 180-185. Рівні експресії представлені таблиці 36-Б.

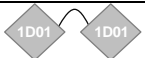





Для дослідження блокуючих властивості антитіл до Ang2 у порівнянні з одновалентними конструктивними елементами двовалентні VHH аналізували щодо блокади взаємодій: людський Ang2/hTie2 (фіг. 21-1), мишачий Ang2/mTie2 (фіг. 21-2), Ang2 мавпи ціномолгус (супо) / сTie2 (фіг. 21-3) і людський Ang1/hTie2 (фіг. 22) за допомогою конкурентного ELISA. Узагальнення даних про значення IC₅₀ представлено у таблиці 37.

Таблиця 36-А

Послідовності двовалентних VHH, мішенню яких є Ang2	
VHH ID	АК-послідовність
ANGBII00001	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREGVSC IRCS DGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASIVP RSKLEPYEYDAWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLR LSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREGVSCIRCS DGSTYYADSVKGRFTI SSDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGT LVT TVSS (SEQ ID NO: 180)











ANGBII00002	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREGVSC IRCS DGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASIVP RSKLEPYEYDAWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFR QAAGKEREGVSCIRCS DGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNSLKP EDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 181)
ANGBII00003	EVQLVESGGGLVQVGDLSRLSCAASGRTFSTYLMVGWFRQAPGKEREFAA GIWSSGDTAYADSVRGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCAGSY DGNYYIPGFYKDWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQVGDLS RLSCAASGRTFSTYLMVGWFRQAPGKEREFAGIWSGDTAYADSVRGRF TISRDNKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCAGSYDGNYYIPGFYKDWGQGTL VTVSS (SEQ ID NO: 182)
ANGBII00004	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSI RDNDGSTYYADSVKGRFTISSDNDKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVPA GRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLV QAGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYYADS VKGRFTISSDNDKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPL YEYDAWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 183)
ANGBII00005	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSI RDNDGSTYYADSVKGRFTISSDNDKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVPA GRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG GGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDD YAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYYADSVKGRFTISSDNDKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 184)
ANGBII00006	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIR DNGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAVPAG RLRYGEQWYPIYEYDAWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNGGSTYYADSVK GRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRYGEQWYPIYEY DAWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 185)

Таблиця 36-Б

VHH ID	Формат	Рівень експресії (мг/л)
ANGBII00001		31
ANGBII00002		37
ANGBII00003		28
ANGBII00004		651
ANGBII00005		203
ANGBII00006		3

5

Таблиця 37: Значення IC_{50} (пМ), які характеризують блокаду взаємодій: людський Ang2/людський Tie2, мишачий Ang2/мишачий Tie2, сусо Ang2/сусо Tie2 і hAng1/hTie2, отримані за допомогою конкурентного ELISA

		hAng2	mAng2	cAng2	Співвідношення hAng1/hAng2
VHH ID	Формат	IC ₅₀ (пМ)	IC ₅₀ (пМ)	IC ₅₀ (пМ)	
1D01		6973	10455	9,484	>10800
ANGBII00001		11	18	27	n.d.
ANGBII00002		20	32	n.d.	n.d.
11B07		15205	10000	16400	> 8570
ANGBII00003		24	47	35	n.d.
00027		541	1785	568	>14878
ANGBII00004		17	33	34	n.d.
ANGBII00005		13	32	n.d.	n.d.
00908		52	85	79	>192014
ANGBII00006		19	28	25	6052631
AMG386		4	3	10	5600

n.d., не визначали

Приклад 10

Конструювання, отримання та характеристика тривалентних VHH, мішенню яких є VEGF і Ang2, створених з використанням антитіла до сироваткового альбуміну для подовження часу напівжиття

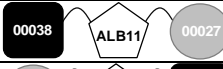


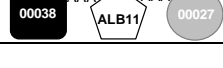
Анти-VEGF VHH VEGFBII00038 (US 2011/0172398 A1) і анти-Ang2 VHH 00027 (SEQ ID NO: 216) застосовували у якості конструктивних елементів для створення біспецифічних VHH VEGFANGBII00001-00004. Генетичне злиття із таким, що зв'язує сироватковий альбумін VHH застосовували у якості методології подовження часу напівжиття. Конструктивні елементи з'єднували через гнучкий лінкер, що містить три Ala або 9 Gly-Ser. VHH отримували і очищали згідно методу, описаного у прикладі 9. Огляд форматів і послідовностей всіх чотирьох біспецифічних VHH представлений на Фіг. 23 і у таблиці 37-А (лінкерні послідовності підкреслені), SEQ ID NO: 186-189. Рівні експресії представлені таблиці 38-Б.

Таблиця 38-А

Послідовності біспецифічних VHH, мішенню яких є VEGF і Ang2	
VHH ID	АК-послідовність
VEGFANGBII00001	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYYADSVKGRFTISSDNDKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 186)
VEGFANGBII00002	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYYADSVKGRFTISSDNDKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFFVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 187)
VEGFANGBII00003	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYYADSVKGRFTISSDNDKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFFVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 188)
VEGFANGBII00004	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGLTVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYYADSVKGRFTISSDNDKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQW
Послідовності біспецифічних VHH, мішенню яких є VEGF і Ang2	
VHH ID	АК-послідовність
	YPLYEYDAWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 189)

Таблиця 38-Б

5


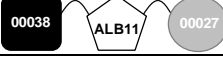
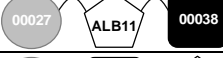
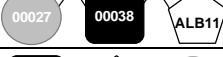

VHH ID	Формат	Рівень експресії (мг/л)
VEGFANGBII00001		13,3
VEGFANGBII00002		11,3
VEGFANGBII00003		15,4
VEGFANGBII00004		19,2

Для дослідження блокуючих властивості антитіл до VEGF у порівнянні з одновалентним конструктивним елементом VEGFBII00038 всі чотири біспецифічних VHH аналізували відносно блокади взаємодії VEGF/VEGFR2-Fc (фіг. 22) за допомогою конкурентного AlphaScreen. у аналіз для його адаптації до розглянутого випадку були внесені невеликі зміни у порівнянні з аналізом, викладеним у прикладі 12.3 у патенті US 2011/0172398 A1. Як людський VEGF165, так і людський VEGFR2-Fc додавали у концентрації 0,05 нМ. Цей аналіз у умовах конкуренції здійснювали також після попередньої інкубації VHH з 25мкМ людським сироватковим

10

альбуміном (ЛСА). Узагальнені дані про значення IC_{50} і % інгібування представлені у таблиці 39.

Таблиця 39: Значення IC_{50} (нМ), які характеризують здатність інгібувати взаємодію: людський VEGF165/ людський VEGFR2, отримані за допомогою конкурентного AlphaScreen


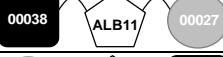


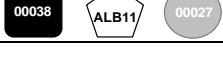
VHH ID	Формат	ЛСА	IC_{50} (нМ)	% інгібування
VEGFBII00038		-	0,5	100
		+	0,5	100
VEGFANGBII00001		-	0,4	100
		+	0,6	100
VEGFANGBII00002		-	0,7	100
		+	1,2	100
VEGFANGBII00003		-	0,6	100
		+	1,3	100
VEGFANGBII00004		-	0,5	100
		+	0,7	100
ранібізумаб		-	0,8	100
		+	1,1	100

5

Для дослідження блокуючих властивостей антитіл до Ang2 у порівнянні з одновалентним конструктивним елементом 00027 (SEQ ID NO: 216) всі чотири біспецифічних VHH аналізували відносно блокади взаємодії людський Ang2/hTie2-Fc (фіг. 25) за допомогою конкурентного ELISA. Цей аналіз здійснювали також після інкубації VHH з 0,5 мкМ людським сироватковим альбуміном. Узагальнені дані про значення IC_{50} представлені у таблиці 40.

10

Таблиця 40: Значення IC_{50} (пМ), які характеризують здатність інгібувати взаємодію людський Ang2/людський Tie2, отримані за допомогою конкурентного ELISA

VHH ID	Формат	ЛСА	IC_{50} (пМ)
00027		-	516
		+	n.d.
VEGFANGBII00001		-	240
		+	179
VEGFANGBII00002		-	463
		+	330
VEGFANGBII00003		-	273
		+	154
VEGFANGBII00004		-	111
		+	92
AMG386		-	2
		+	n.d.

n.d., не визначали

15

Приклад 11

Конструювання, отримання та характеристика тривалентних і чотирьохвалентних VHH, мішенню яких є VEGF і Ang2, створених з використанням антитіла до сироваткового альбуміну для подовження часу напівжиття

20

Створювали десять біспецифічних VHH, мішенню яких є VEGF і Ang2 (VEGFANGBII00005-00015). У ці конструкції включали одновалентні і двовалентні конструктивні елементи 1D01 (SEQ ID NO: 214), одновалентні і двовалентні конструктивні елементи 7G08 (SEQ ID NO: 215) і двовалентний конструктивний елемент 00027 (SEQ ID NO: 216) анти-Ang2. Генетичне злиття із таким, що зв'язує сироватковий альбумін VHH застосовували у якості методології подовження часу напівжиття. Конструктивні елементи з'єднували через гнучкий лінкер 9 Gly-Ser. VHH отримували і очищали згідно методу, описаного у прикладі 8. Огляд форматів і послідовностей всіх десяти біспецифічних VHH представлений на Фіг. 26 і у таблиці 41-А (лінкерні послідовності підкреслені), SEQ ID NO: 190-199. Рівні експресії представлені таблиці 41-Б.

25










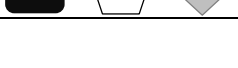
Таблиця 41-А

Послідовності біспецифічних VHH, мішенню яких є VEGF і Ang2	
VHH ID	АК-послідовність
VEGFANGBII00005	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFALDYAIGWFRQVPGKEREGVSCISSSDGITYYVDSVKGRFTI SRDNANKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCATDSGGYIDYDCMGLGYDYWGQG TLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANKTTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 190)
VEGFANGBII00006	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTI

Послідовності біспецифічних VHH, мішенню яких є VEGF і Ang2	
VHH ID	АК-послідовність
	SRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYAIGWFRQVPGKEREGVSCISSSDGITYYVDSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSLRKPEDTAVYYCATDSGGYIDYDCMGLGYDYWGQGTTLTVTVSS (SEQ ID NO: 191)
VEGFANGBII00007	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYAIGWFRQVPGKEREGVSCISSSDGITYYVDSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSLRKPEDTAVYYCATDSGGYIDYDCMGLGYDYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYAIGWFRQVPGKEREGVSCISSSDGITYYVDSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSLRKPEDTAVYYCATDSGGYIDYDCMGLGYDYWGQGTTLTVTVSS (SEQ ID NO: 192)
VEGFANGBII00008	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYYADSVKGRFTISSDNDKNTVYLQMNSLRKPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYYADSVKGRFTISSDNDKNTVYLQMNSLRKPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLTVTVSS (SEQ ID NO: 193)
VEGFANGBII00009	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNANTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYYADSVKGRFTISSDNDKNTVYLQMNSLRKPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYYADSVKGRFTISSDNDKNTVYLQMNSLRKPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGTTLTVTVSS (SEQ ID NO: 194)
VEGFANGBII00010	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYYADSVKGRFTISRDNANTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNDGSTYYADSVKGRFTISSDNDKNTVYLQMNSLRKPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGTTLTVTVSS (SEQ ID NO: 195)
VEGFANGBII00011	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREGVSCIRCSDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNSLRKPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREGVSCIRCSDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNSLRKPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGTTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS

Послідовності біспецифічних VHH, мішенню яких є VEGF і Ang2	
VHH ID	АК-послідовність
	DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 196)
VEGFANGBII00012	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREGVSCIRCS DGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 197)
VEGFANGBII00013	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREGVSCIRCS DGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREGVSCIRCS DGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 198)
VEGFANGBII00014	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAAGKEREGVSCIRCS DGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 199)

Таблиця 41-Б

VHH ID	Формат	Рівень експресії (мг/л)
VEGFANGBII00005		1,3
VEGFANGBII00006		1,3
VEGFANGBII00007		0,3
VEGFANGBII00008		30,0
VEGFANGBII00009		71,4
VEGFANGBII00010		25,0
VEGFANGBII00011		4,0
VEGFANGBII00012		6,6
VEGFANGBII00013		2,9
VEGFANGBII00014		45,6

Для дослідження блокуючих властивості антитіл до VEGF у порівнянні з одновалентним конструктивним елементом VEGFBII00038 всі десять біспецифічних VHH аналізували відносно блокади взаємодії: VEGF/VEGFR2-Fc (приклад 10, фіг. 27-1) і VEGF/VEGFR1 (фіг. 27-2) за допомогою конкурентного AlphaScreen. Аналіз для VEGFR1 злегка адаптували у порівнянні з аналізом, викладеним у прикладі 12.4 у патенті US 2011/0172398 A1. Як людський VEGF165, так і людський VEGFR2-Fc додавали у концентрації 0,05 нМ. Ці аналізи у умовах конкуренції здійснювали також після попередньої інкубації VHH з 25 мкМ людським сироватковим альбуміном. Узагальнені дані про значення IC₅₀ представлені у таблиці 42.













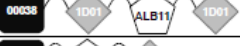
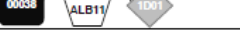
Таблиця 42: Значення IC₅₀ (нМ), які характеризують здатність інгібувати взаємодії: людський VEGF165/людський VEGFR2 і людський VEGF165/людський VEGFR1, отримані за допомогою конкурентного AlphaScreen

VHH ID	Формат	ЛСА	VEGFR1		VEGFR2	
			IC ₅₀ (нМ)	% інгібування	IC ₅₀ (нМ)	% інгібування
VEGFBII00038		-	0,6	67	0,5	100
		+	0,6	64	0,5	100
VEGFANGBII00005		-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII00006		-	0,8	64	1,0	100
		+	1,0	71	1,4	100
VEGFANGBII00007		-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII00008		-	0,6	77	0,3	100
		+	0,7	73	0,4	100
VEGFANGBII00009		-	0,8	71	0,4	100
		+	1,5	72	0,7	100
VEGFANGBII00010		-	0,5	72	0,3	100
		+	1,1	78	0,7	100
VEGFANGBII00001		-	0,6	68	0,4	100
		+	0,8	76	0,6	100
VEGFANGBII00011		-	0,8	74	0,9	100
		+	2,5	81	0,8	100
VEGFANGBII00012		-	1,0	74	0,4	100
		+	1,5	80	0,7	100
VEGFANGBII00013		-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII00014		-	0,8	69	0,4	100
		+	1,0	80	0,7	100
Ранібізумаб		-	2,5	92	1,2	100
		+	5,3	86	1,1	100

n.d., не визначали

Для дослідження блокуючих властивості антитіл до Ang2 у порівнянні з відповідним одновалентним конструктивним елементом 7G08 (SEQ ID NO: 215), 1D01 (SEQ ID NO: 214) і 00027 (SEQ ID NO: 216) всі десять біспецифічних VHH аналізували відносно блокади взаємодії: людський Ang2/hTie2-Fc (див. приклад 5.1, фіг. 28-1), мишачий Ang2/mTie2-Fc (див. приклад 5.2; фіг. 28-2) і суро Ang2/cTie2-Fc (див. приклад 5.2; фіг. 28-3) за допомогою конкурентного ELISA. Цей аналіз здійснювали також після інкубації VHH з 0,5 мкМ людським сироватковим альбуміном. Додатково здійснювали аналіз опосередкованої hAng2 виживаності клітин HUVEC (див. приклад 5.5; фіг. 29). Узагальнені дані про значення IC₅₀ і % інгібування представлені у таблиці 43.

Таблиця 43: Значення IC₅₀ (пМ) і % інгібування, які характеризують здатність інгібувати взаємодії: людський Ang2/людський Tie2, мишачий Ang2/мишачий Tie2 і суро Ang2/суро Tie2, отримані за допомогою конкурентного ELISA, і значення IC₅₀ (нМ) і % інгібування, отримані при аналізі опосередкованої hAng2 виживаності клітин HUVEC

VHH ID	Формат	ЛСА	hAng2		mAng2		cAng2		Вживання клітин HUVEC	
			IC ₅₀ (нМ)	% інг.	IC ₅₀ (нМ)	% інг.	IC ₅₀ (нМ)	% інг.	IC ₅₀ (нМ)	% інг.
7G08		+	110	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,5	100
		-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII0 0005		-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII0 0006		-	560	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,9	100
		+	400	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII0 0007		-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AMG386		-	5	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,2	100
		+	4	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
00027		-	540	100	1,800	100	570	100	2,0	100
		+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII0 0001		-	360	100	1,300	100	390	100	5,7	100
		+	290	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII0 0008		-	47	100	71	100	79	100	5,6	100
		+	52	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII0 0009		-	33	100	36	100	46	100	3,6	100
		+	39	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII0 0010		-	32	100	78	100	59	100	n.d.	n.d.
		+	49	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AMG386		-	5	100	4	100	3	100	1,3	100
		+	4	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1D01		-	7,000	100	10,000	100	9,500	100	7,8	100
		+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII0 0011		-	31	100	56	100	95	100	3,7	100
		+	34	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VHH ID	Формат	ЛСА	hAng2		mAng2		cAng2		Вживання клітин HUVEC	
			IC ₅₀ (нМ)	% інг.	IC ₅₀ (нМ)	% інг.	IC ₅₀ (нМ)	% інг.	IC ₅₀ (нМ)	% інг.
VEGFANGBII0 0012		-	40	100	68	100	100	100	3,6	100
		+	65	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII0 0013		-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII0 0014		-	710	100	1,000	100	1,100	100	n.d.	n.d.
		+	1,200	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AMG386		-	4	100	4	100	10	100	1,3	
		+	4	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d., не визначали

- Визначали афінність до людського сироваткового альбуміну, результати представлені у таблиці 44. у цілому, метод полягав у наступному: людський сироватковий альбумін (фірма Sigma, Сент-Луїс, шт. Міссурі, США) іммобілізували на CM5-чипі шляхом амінного поєднання. Використовували підхід, заснований на застосуванні декількох циклів кінетичного аналізу: ін'єктували VHH у зростаючих концентраціях (2-8-31-125-500нМ) і давали пройти реакції асоціацію протягом 2 хв і дисоціації протягом 10 хв при швидкості потоку 100 мкл / хв. Між ін'єкціями VHH поверхні регенерували з використанням імпульсного внесення протягом 10 з 10мм гліцину-HCl, pH 1,5 і 60-секундного періоду стабілізації. Результати асоціації / дисоціації оцінювали шляхом апроксимації з використанням моделі взаємодії 1:1 (зв'язування по Ленгмюру) або моделі на основі гетерогенних лігандів. Константу афінності K_D розраховували на основі констант швидкості асоціації і дисоціації (k_a) і (k_d) (таблиця 44).
- Таблиця 44: Афінність (K_D) очищених VHH до людського (ЛСА), мавп циномолгус (ЦСА) і мишачому сироватковому альбуміну (МСА)

	ЛСА			ЦСА			МСА		
	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	K_D (нМ)	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	K_D (нМ)	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	K_D (нМ)
ALB11	4,5E+05	1,8E-03	4	4,3E+05	1,6E-03	4	6,6E+05	3,2E-02	49
VEGFANGBII00001	2,3E+05	4,8E-03	22	1,8E+05	4,3E-03	24	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII00005	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII00006	2,0E+05	4,6E-03	22	1,5E+05	4,5E-03	30	1,7E+05	6,0E-02	360
VEGFANGBII00007	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII00008	1,3E+05	4,3E-03	34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII00009	1,5E+05	4,6E-03	30	1,1E+05	4,2E-03	39	1,2E+05	4,0E-02	340
VEGFANGBII00010	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII00011	1,3E+05	4,0E-03	31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII00012	1,5E+05	4,3E-03	31	1,2E+05	4,2E-03	24	1,0E+05	2,5E-02	240
VEGFANGBII0013	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII0014	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. - не визначали

Приклад 12

- 5 Конструювання, одержання і характеристика біспецифічних VHH з оптимізованою послідовністю і дозрілою афінністю, мішенню яких є VEGF і Ang2, створених з використанням зв'язування з антитілом до сироваткового альбуміну для подовження часу напівжиття

- Створювали 14 біспецифічних VHH, мішенню яких є VEGF і Ang2 (VEGFANGBII00015-00028). У ці конструкції у якості анти-Ang2 конструктивних елементів включали двовалентний 00921 (варіант 1D01 з оптимізованою послідовністю) (SEQ ID NO: 220), одновалентні VHH 00908 - 00932 - 00933 - 00934 - 00935 - 00936 - 00937 - 00938 (варіанти 28D10 з оптимізованою послідовністю / с дозрілою афінністю) (SEQ ID NO: 222), двовалентний 00956 (SEQ ID NO: 223) (варіант 28D10 з оптимізованою послідовністю) і одновалентний 00928 (SEQ ID NO: 221) (варіант 37F02 з оптимізованою послідовністю). Генетичне злиття із таким, що зв'язує сироватковий альбумін VHH застосовували у якості методології подовження часу напівжиття.
- 15 Конструктивні елементи з'єднували через гнучкий лінкер 9 Gly-Ser. Огляд форматів і послідовностей всіх 14 біспецифічних VHH представлений на фіг. 30 і у таблиці 45-A (лінкерні послідовності підкреслені), SEQ ID NO: 200-213. Рівні експресії представлені у таблиці 45-B.

Таблиця 45-A


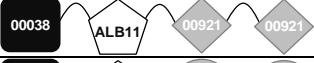
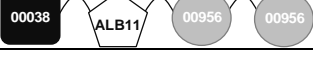
Послідовності біспецифічних VHH, мішенню яких є VEGF і Ang2	
VHH ID	АК-послідовність
VEGFANGBII00015	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRYGEQWYPIEYDAWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 200)
VEGFANGBII00016	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRDNGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRYGEQWYPIEYDAWGQGLTVTVSS SEQ ID NO: 201)

Послідовності біспецифічних VHH, мішенню яких є VEGF і Ang2	
VHH ID	АК-послідовність
VEGFANGBII00017	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTI SRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGV SAIRDNGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAV PAGRLRYGEQWYPIYEYDAWGQGLTVTVSS SEQ ID NO: 202)
VEGFANGBII00018	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTI SRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGV SAIRESGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAV PAGRLRYGEQWYPIYEYDAWGQGLTVTVSS SEQ ID NO: 203)
VEGFANGBII00019	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTI SRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGV SAIRSSGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAV PAGRLRYGEQWYPIYEYDAWGQGLTVTVSS SEQ ID NO: 204)
VEGFANGBII00020	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTI SRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGV SAIRDNGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAV PAGRLRYGEQWYPIYEYDAWGQGLTVTVSS SEQ ID NO: 205)
VEGFANGBII00021	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTI SRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGV SAIRESGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAV PAGRLRYGEQWYPIYEYDAWGQGLTVTVSS SEQ ID NO: 206)
VEGFANGBII00022	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTI SRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGITLDDYAIGWFRQAPGKEREGV SAIRSSGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAV PAGRLRYGEQWYPIYEYDAWGQGLTVTVSS SEQ ID NO: 207)

Послідовності біспецифічних VHH, мішенню яких є VEGF і Ang2	
VHH ID	AK-послідовність
VEGFANGBII00023	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTI SRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREV SAIRDNGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAV PAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREVSAIRDNGGSTYYAD SVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPL YEYDAWGQGLTVTVSS SEQ ID NO: 208)
VEGFANGBII00024	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREVSAIRDNGGSTYYADSVKGRFT ISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAW GQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDY AIGWFRQAPGKEREVSAIRDNGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQM NSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGLTVTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGL EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYC TIGGSLSRSSQGLTVTVSS SEQ ID NO: 209)
VEGFANGBII00025	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTI SRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAPGKEREV VSCIRCSGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA SIVPRSKLEPYEYDAWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFDDYALGWFRQAPGKEREVSCIRCSGGSTYYADSVKGR FTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGL LTVTVSS SEQ ID NO: 210)
VEGFANGBII00026	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFDDYALGWFRQAPGKEREVSCIRCSGGSTYYADSVKGRFT ISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGLTV TVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYALGWFR QAPGKEREVSCIRCSGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPED TAVYYCAASIVPRSKLEPYEYDAWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGL TVTVSS SEQ ID NO: 211)
VEGFANGBII00027	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTI SRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYAIGWFRQAPGKEREV VSCISSGGITYYADSVKGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCATD SGGYIDYDCSGLGYDYWGQGLTVTVSS SEQ ID NO: 212)

Послідовності біспецифічних VHH, мішенню яких є VEGF і Ang2	
VHH ID	АК-послідовність
VEGFANGBII00028	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAI SKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYG SSRLRLADTYEYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTI SRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGV SAIRSSGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAV PAGRLRFGEQWYPLYEYDAWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSAIRSSGGSTYYAD SVKGRFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRFGEQWYPL YEYDAWGQGLTVTVSS SEQ ID NO: 213)

Таблиця 45-Б

VHH ID	Формат	Рівень експресії (мг/л)
VEGFANGBII00022		
VEGFANGBII00025		
VEGFANGBII00028		


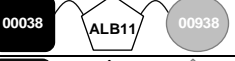


5

Для дослідження блокуючих властивості антитіл до VEGF у порівнянні з одновалентним конструктивним елементом VEGFBII00038 біспецифічні VHH аналізували відносно блокади взаємодії VEGF/VEGFR2-Fc (приклад 10, фіг. 31-1) і VEGF/VEGFR1 (приклад 11, фіг. 31-2) за допомогою конкурентного AlphaScreen. Ці аналізи у умовах конкуренції здійснювали також після попередньої інкубації VHH з 25 мкМ людським сироватковим альбуміном. Узагальнені дані про значення IC₅₀ представлені у таблиці 46-А.

10

Таблиця 46-А: Значення IC₅₀ (нМ), які характеризують здатність інгібувати взаємодії: людський VEGF165/людський VEGFR2 і людський VEGF165/людський VEGFR1, отримані за допомогою конкурентного AlphaScreen

15

VHH ID	Формат	ЛСА	VEGFR1		VEGFR2	
			IC ₅₀ (нМ)	% інгібування	IC ₅₀ (нМ)	% інгібування
VEGFBII00038		-	0,4	57	0,2	100
		+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VEGFANGBII00022		-	0,4	64	0,2	100
		+	0,6	75	0,3	100
VEGFANGBII00025		-	0,6	68	0,2	100
		+	0,9	75	0,3	100
VEGFANGBII00028		-	0,5	64	0,2	100
		+	0,5	64	0,2	100
ранібізумаб		-	3,2	97	0,7	100
		+	n.d.	n.d.	0,9	100

n.d., не визначали

Кінетичні характеристики зв'язування біспецифічних VHH з людським VEGF165 аналізували за допомогою SPR з використанням пристрою Biacore T100 (див. приклад 12.5 у патенті US 2011/0172398 A1). Одновалентне Nanobody VEGFBII00038 застосовували одночасно у якості стандарту (таблиця 46-Б).

20

Таблиця 46-Б: Узагальнення даних про кінетичні параметри, отриманих за допомогою Biacore-аналізу з використанням hVEGF165

	K_{a1} (1/Mc)	K_{d1} (1/c)	K_{a2} (1/c)	K_{d2} (1/c)	K_{D1} (M)
VEGFBI00038	2,6E+05	1,3E-02	1,3E-02	1,9E-04	7,5E-10
VEGFANGBI00022	1,6E+05	1,4E-02	1,4E-02	2,2E-04	1,4E-09
VEGFANGBI00025	1,1E+05	1,4E-02	1,4E-02	2,1E-04	1,9E-09
VEGFANGBI00028	1,7E+05	1,3E-02	1,3E-02	2,1E-04	1,1E-09

Здатність VHH зв'язуватися з ізоформою людського VEGF121 визначали за допомогою ELISA, призначеного для оцінки зв'язування. Зв'язування серій розведень VHH з людським VEGF121 (фірма R & D), який у концентрації 1 мкг / мл застосовували для безпосередньої сенсibilізації планшетів (людський VEGF165 застосовували у якості стандарту), визначали з використанням біотинільованого антитіла до VHH 1A4, а потім екстравiдину-HRP. 1A4 являє собою антитіло до VHH у вигляді VHH (створене у лабораторії фірми Ablynx NV). Еталонний засіб авастин слугував у якості позитивного контролю і для його виявлення використовували кон'юговане з HRP антитіло до людського Fc. «Невідповідний» VHH слугував у якості негативного контролю. Репрезентативні криві, що описують зв'язування з VEGF165 і VEGF121, представлені на фіг. 46, відповідні значення EC_{50} узагальнені у таблиці 46-B.

Таблиця 46-B: Узагальнені дані про значення EC_{50} , характеризують зв'язування з hVEGF165 і hVEGF121, отримані за допомогою ELISA







	hVEGF165	hVEGF121
	EC_{50} (M)	EC_{50} (M)
VEGFANGBI00022	1,4E-09	2,3 ^E -09
VEGFANGBI00025	1,5E-09	2,5 ^E -09
VEGFANGBI00028	1,2E-09	2,1 ^E -09

Зв'язування з щурячим і мишачим VEGF164 оцінювали за допомогою ELISA, призначеного для оцінки зв'язування. Зв'язування VHH з мишачим або щурячим VEGF164 (фірма R & D), який у концентрації 1 мкг / мл застосовували для безпосередньої сенсibilізації планшетів, оцінювали з використанням біотинільованого антитіла до VHH 1A4, а потім екстравiдину-HRP. у якості позитивного контролю титрували мишаче / щуряче моноклональне антитіло що має перехресну реактивність B20-4.1 (фірма Genentech) і виявляли за допомогою кон'югованого з HRP антитіла до людського Fc. «невідповідний» VHH слугував у якості негативного контролю. Результати представлені на фіг. 33. Всі три біспецифічних VHH не давали перехресну реакцію з мишачим і щурячим VEGF.

Зв'язування з людськими VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D і PlGF оцінювали за допомогою ELISA, призначеного для оцінки зв'язування. Зв'язування VHH з VEGF-B (фірма R & D), VEGF-C (фірма R & D), VEGF-D (фірма R & D) і PlGF (фірма R & D), які у концентрації 1 мкг / мл застосовували для безпосередньої сенсibilізації планшетів, оцінювали з використанням біотинільованого антитіла до VHH 1A4, а потім екстравiдину-HRP. у якості позитивного контролю застосовували паралельно серії розведень відповідних рецепторів (hVEGFR1-Fc для hVEGF-B і hPlGF, hVEGFR2-Fc для hVEGF-C, MAT до hVEGF-D (фірма R & D) для hVEGF-D). «невідповідний» VHH слугував у якості негативного контролю. Результати представлені на фіг. 34. Всі три біспецифічних VHH не зв'язувалися з представниками сімейства VEGF.

Для дослідження блокуючих властивості антитіл до Ang2 у порівнянні з відповідним одновалентним конструктивним елементом 00921 (SEQ ID NO: 220) і 00 938 (SEQ ID NO: 222) всі три біспецифічних VHH аналізували відносно блокади взаємодії людський Ang2/hTie2-Fc (див. приклад 5.1, фіг. 35-1), мишачий Ang2/mTie2-Fc (див. приклад 5.2; фіг. 35-2) і супо Ang2/cTie2-Fc (див. приклад 5.2; фіг. 35-3) за допомогою конкурентного ELISA. Аналіз з людськими компонентами здійснювали також після інкубації VHH з 0,5 мкМ людським сироватковим альбуміном. Крім того, біспецифічні VHH тестували відносно взаємодії hAng1/hTie2 за допомогою конкурентного ELISA (див. приклад 5.3; фіг. 36) і здійснювали аналіз опосередкованого hAng2 виживання клітин HUVEC (див. приклад 5.5; фіг. 37). Узагальнені дані про значення IC_{50} та% інгібування представлені у таблиці 47-A.

Таблиця 47-A: Значення IC_{50} (пМ), які характеризують здатність інгібувати взаємодії: людський Ang2/людський Tie2, мишачий Ang2/мишачий Tie2 і супо Ang2/супо Tie2, отримані за допомогою конкурентного ELISA, hAng1-ELISA, і значення IC_{50} (нМ), отримані при аналізі опосередкованого hAng2 виживання клітин HUVEC

			ELISA							Вживання клітин HUVEC	
			Ang2		mAng2		cAng2		hAng1		
VHH ID	Формат	ЛСА	IC ₅₀ (nM)	% інг.	IC ₅₀ (nM)	% інг.	IC ₅₀ (nM)	% інг.	Відношення IC ₅₀ hAng1/hAng2	IC ₅₀ (nM)	% інг.
00938		-	33	100	58	100	86	100	> 60,395	4,3	100
VEGFANGBII00022		-	50	100	56	100	101	100	> 39,902	1,9	100
		+	45	100	68	100	115	100	> 44,771	n.d.	n.d.
AMG386		-	5	100	2	100	13	100	5,656	1,4	100
00921		-	15,940	100	27,990	100	43,500	100	> 125	18,8	100
VEGFANGBII00025		-	12	100	15	100	38	100	> 160,694	2,2	100
		+	15	100	17	100	37	100	> 133,660	n.d.	n.d.
AMG386		-	5	100	2	100	15	100	5,632	1,2	100
00956		-	1,010	100	1,816	100	1,294	100	> 1,979	6,8	100
VEGFANGBII00028		-	30	100	72	100	65	100	> 66,222	3,7	100
		+	39	100	69	100	78	100	> 50,816	n.d.	n.d.
AMG386		-	4	100	3	100	14	100	5,194	1,0	100

n.d. – не визначали

Визначали афінність VEGFANGBII00022-25-28 до людського, мишачого, мавпячого (ціномолгус) і щурячого Ang2 (див. приклад 5.4), дані представлені у таблиці 47-Б.

5 Таблиця 47-Б: Афінність (KD) очищених VHN до рекомбінантного людського, суну, мишачого і щурячого Ang2

	людський Ang2-FLD			cyno Ang2-FLD		
	k _a (1/Mc)	k _d (1/c)	K _D (M)	k _a (1/Mc)	k _d (1/c)	K _D (M)
VEGFANGBII00022	9,7E+05	1,5E-05	1,6E-11	1,5E+06	1,3E-05	8,1E-12
VEGFANGBII00025	2,7E+06	1,2E-02	4,5E-09	4,3E+06	1,1E-02	2,7E-09
VEGFANGBII00028	5,9E+05	9,6E-04	1,6E-09	8,4E+05	8,7E-04	1,0E-09

	мишачий Ang2-FLD			щурячий Ang2-FLD		
	k _a (1/Mc)	k _d (1/c)	K _D (M)	k _a (1/Mc)	k _d (1/c)	K _D (M)
VEGFANGBII00022	5,5E+05	2,8E-05	5,1E-11	3,9E+05	3,8E-05	9,9E-11
VEGFANGBII00025	1,3E+06	1,4E-02	1,1E-08	8,7E+05	2,9E-02	3,3E-08
VEGFANGBII00028	3,6E+05	2,0E-03	5,6E-09	2,5E+05	3,1E-03	1,2E-08

10 Визначали афінність VEGFANGBII00022-25-28 до людського, мишачого і мавпячого (ціномолгус) сироваткового альбуміну (приклад 11), і результати представлені у таблиці 48. константу афінності (K_D) розраховували на основі констант швидкості асоціації і дисоціації (k_a) і (k_d) (таблиця 48).

15 Таблиця 48: Афінність (KD, нм) очищених VHN до рекомбінантного людського, мишачого і мавпячого (ціномолгус) сироваткового альбуміну, визначена з використанням моделі взаємодії 1:1 (A) або моделі на основі гетерогенних лігандів (Б)

(A)	ЛСА			ЦСА		
	k _a (1/Mc)	k _d (1/c)	K _D (нМ)	k _a (1/Mc)	k _d (1/c)	K _D (нМ)
ALB11	5,6E+05	1,9E-03	4	4,5E+05	1,7E-03	4
VEGFANGBII00022	6,7E+05	6,0E-03	9	6,2E+05	5,4E-03	9
VEGFANGBII00025	5,6E+05	5,6E-03	12	4,3E+05	5,1E-03	12
VEGFANGBII00028	5,6E+05	5,8E-03	10	5,2E+05	5,3E-03	10

	MCA		
	k _a (1/Mc)	k _d (1/c)	K _D (нМ)
ALB11	5,9E+05	3,0E-02	51
VEGFANGBII00022	5,2E+05	5,4E-03	150
VEGFANGBII00025	-	-	-
VEGFANGBII00028	-	-	-

(Б)	MCA					
	k_{a1} (1/Mc)	k_{d1} (1/c)	k_{a2} (1/c)	k_{d2} (1/c)	K_{D1} (нМ)	K_{D2} (нМ)
VEGFANGBII00025	6,2E+05	9,9E-02	4,7E+04	5,7E-04	160 *	12
VEGFANGBII00028	5,9E+04	6,9E-04	5,7E+05	9,4E-02	12	160 *

* описує 70% або більше взаємодій

Ang2- зв'язуючі компоненти (Таблиця 49)

(1D01 (SEQ ID NO: 214); 7G08 (SEQ ID NO: 215); 027 (SEQ ID NO: 216); 00042 (SEQ ID NO: 217); 00050 (SEQ ID NO: 218); 00045 (SEQ ID NO: 219); 00921 (SEQ ID NO: 220); 00928 (SEQ ID NO: 221); 00938 (SEQ ID NO: 222); 00956 (SEQ ID NO: 223))

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
1D01	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFD	DYALG	WFRQAAGKEREQVS	CIRCSDBGSTYYADSVKG
7G08	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALD	YYAIG	WFRQVPGKEREQVS	CISSSDGITYYVDSVKG
027	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLD	DYAIG	WFRQAPGKEREQVS	CIRSDGSGSTYYADSVKG
	FR3	CDR3	FR4	
1D01	RFTISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA	SIVPRSKLEPYEYDA	WGQGTQVTVSS	
7G08	RFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAT	DSGGYIDYDCMGLGYDY	WGQGTQVTVSS	
027	RFTISSDNDKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA	VPAGRLRFGEQWYPLYEYDA	WGQGTQVTVSS	
	FR1	CDR1	FR2	CDR2
00042	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLD	DYAIG	WFRQAPGKEREQVS	SIRDNDGSGSTYYADSVKG
00050	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFD	DYALG	WFRQAPGKEREQVS	CIRCSDBGSTYYADSVKG
00045	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALD	YYAIG	WFRQAPGKEREQVS	CISSSDGITYYADSVKG
	FR3	CDR3	FR4	
00042	RFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA	VPAGRLRFGEQWYPLYEYDA	WGQGTQVTVSS	
00050	RFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA	SIVPRSKLEPYEYDA	WGQGTQVTVSS	
00045	RFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAT	DSGGYIDYDCMGLGYDY	WGQGTQVTVSS	
	FR1	CDR1	FR2	CDR2
00921	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFD	DYALG	WFRQAPGKEREQVS	CIRCSGGSTYYADSVKG
00928	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALD	YYAIG	WFRQAPGKEREQVS	CISSSGGITYYADSVKG
00938	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGITLD	DYAIG	WFRQAPGKEREQVS	AIRSSGGSTYYADSVKG
00956	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLD	DYAIG	WFRQAPGKEREQVS	AIRSSGGSTYYADSVKG
	FR3	CDR3	FR4	
00921	RFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA	SIVPRSKLEPYEYDA	WGQGTQVTVSS	
00928	RFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAT	DSGGYIDYDCMGLGYDY	WGQGTQVTVSS	
00938	RFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA	VPAGRLRYGEQWYPIYEYDA	WGQGTQVTVSS	
00956	RFTISSDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA	VPAGRLRFGEQWYPLYEYDA	WGQGTQVTVSS	

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Бьорінгер Інгельхайм Інтернаціональ ГмбХ

<120> Віспецифічні зв'язуючі молекули, які зв'язуються з VEGF і ANG2

<130> 12-0332-pct

<160> 275

<170> PatentIn, версія 3.3

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Lama glama

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Хаа може означати Gly або Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Хаа може означати Ser або Gly

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Хаа може означати Gly, Ala або Pro

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Хаа може означати Asp або Gly

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Хаа може означати Asp або Glu

<400> 1

Ser Arg Ala Tyr Xaa Ser Xaa Arg Leu Arg Leu Xaa Xaa Thr Tyr Xaa

1

5

10

15

Tyr

<210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 2

Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Gly Asp Thr Tyr Asp
 1 5 10 15

Tyr

<210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 3

Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Asp
 1 5 10 15

Tyr

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 4

Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Glu
 1 5 10 15

Tyr

<210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 5

Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Gly Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Asp
 1 5 10 15

Tyr

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 6

Ser Arg Ala Tyr Ala Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Asp
 1 5 10 15

Tyr

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 7

Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Pro Asp Thr Tyr Asp
 1 5 10 15

Tyr

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 8

Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Pro Gly Thr Tyr Asp
 1 5 10 15

Tyr

<210> 9
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 9

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

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

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

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

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

Leu Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys ...
 85 90 95

Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr
 100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 10
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 10

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

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

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

Val Ala Ile Ser Ser Gly Gly Phe Ile Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
 50 55 60

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

Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
 100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 11
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 11

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

. Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

Leu Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr
 100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 12
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 12

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

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

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

Val Ala Ile Ser Ser Ser Gly Asn Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Gly Asp Thr
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 13
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 13

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Ser Ser Ser Tyr
20 25 30

```

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

Val Ala Ile Ser Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asp Ser Val Ser Leu Gln
      50              55              60

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

Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
      85              90              95

Ala Ser Arg Ala Tyr Ala Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
      100             105             110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
      115             120             125

<210> 14
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 14

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
      20              25              30

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

Val Ala Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Ile Tyr Asp Ser Val Ser Leu Gln
      50              55              60

```

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

Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 15
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 15

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

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

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

Val Ala Ile Ser Ser Gly Gly Phe Ile Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 16
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 16

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

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

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

Val Ala Ile Ser Asn Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 17
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 17

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

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

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

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

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

Leu Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Pro Asp Thr
 100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 18
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 18

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp

```

1              5              10              15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
      20              25              30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
      50              55              60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
      100             105             110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
      115             120             125

<210> 19
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 19

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

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

-----

Ser Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

```

```

35          40          45

Val Ala Ile Ser Ser Gly Gly Phe Ile Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50          55          60

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

Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85          90          95

Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100         105         110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115         120         125

<210>  20
<211> 125
<212>  PRT
<213> Lama glama

<400>  20

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Ser Ser Ser Tyr
20         25         30

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

Val Ala Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Ile Tyr Asp Ser Val Ser Leu Gln
50         55         60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Thr Val Tyr Leu

```

```

65              70              75              80

Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
              85              90              95

Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
              100              105              110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
              115              120              125

<210>  21
<211> 126
<212>  PRT
<213> Lama glama

<400>  21

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

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

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

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

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

Leu Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys
              85              90              95

Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr

```

```

100                               105                               110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115                               120                               125

-

<210> 22
<211> 126
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 22

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

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

-

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

Val Ala Ile Ser Ser Ser Gly Asn Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu
50                               55                               60

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

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

Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Gly Asp Thr
100                               105                               110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115                               120                               125

-

<210> 23

```

<211> 126
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 23

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

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

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

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

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

Leu Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr
 100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 24
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 24

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

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

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

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

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

Leu Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Pro Gly Thr
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 25
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 25

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Ser Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Ile Tyr Asp Ser Val Ser Leu Gln
50 55 60

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

Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 26
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

- <400> 26

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

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

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

Val Ala Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Gly Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 27
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 27

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Ser Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Gln Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Val Ala Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Ile Tyr Asp Ser Val Ser Leu Gln
50 55 60

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

Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 28
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 28

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ile Ala Ser Gly Arg Thr Ser Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Gln Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Val Ala Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Ile Tyr Asp Ser Val Ser Leu Gln
50 55 60

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

Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 29
<211> 126

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 29

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

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

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

Val Ala Ile Ser Ser Ser Gly Asn Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Gly Asp Thr
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Arg Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 30

<211> 126

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 30

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

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

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

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

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

Leu Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 31
<211> 126
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 31

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

Pro Leu Lys Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 32
<211> 126
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 32

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

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

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

Val Ala Ile Ser Ser Ser Gly Asn Tyr Lys Tyr Asp Ser Ala Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Gly Asp Thr
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 33
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 33

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

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

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

Val Ala Ile Ser Ser Gly Gly Phe Ile Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Gly Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

```

-
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
      115              120              125

<210> 34
<211> 126
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 34

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

-
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
      20              25              30

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

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

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Ala Val Tyr
- 65              70              75              80

Leu Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys
      85              90              95

Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr
      100              105              110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
      115              120              125

-
<210> 35
<211> 126
<212> PRT

```

<213> Lama glama

<400> 35

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

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

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

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

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

Leu Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 36

<211> 125

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 36

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 Phe Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Ser Gly Gly Phe Ile Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 37
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 37

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

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

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

Val Ala Ile Ser Ser Gly Gly Phe Ile Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 38
<211> 126
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 38

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 39
<211> 126
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 39

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

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

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

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

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

Leu Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 40

<211> 125

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 40

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Ser Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Val Ala Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Ile Tyr Asp Ser Val Ser Leu Gln
50 55 60

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

Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 41

<211> 126

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 41

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

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

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

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

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

Leu Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 42

<211> 126

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 42

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

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

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

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 43

<211> 125

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 43

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Val Ala Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu

50

55

60

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

Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ala Ser Arg Ala Tyr Ala Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 44

<211> 126

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 44

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

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

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

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

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

Leu Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

```

      85              90              95
Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr
      100              105              110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
      115              120              125

<210> 45
<211> 126
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 45

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

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

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

Val Ala Ile Ser Ser Ser Gly Asn Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu
      50              55              60

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

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

Ala Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Gly Asp Thr
      100              105              110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

```

```

      115              120              125
.
<210>  46
<211>  125
<212>  PRT
<213>  Lama glama

<400>  46

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

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

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

Val Ala Ile Ala Ser Gly Gly Tyr Ile Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
      50              55              60

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

Gln Thr Pro Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
      85              90              95

Ala Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
      100             105             110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
      115             120             125

<210>  47
<211>  125
<212>  PRT
<213>  Штучна

```

<220>

<223> Мутантна послідовністьLama glama

<400> 47

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

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

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 48

<211> 125

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовністьLama glama

<400> 48

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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 49

<211> 125

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 49

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 Glu Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr


```

                20                25                30
Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
      35                40                45

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
      50                55                60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
      100                105                110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115                120                125

<210> 50
<211> 125
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 50

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
      20                25                30

```

```

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

```

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 51
<211> 125
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 51

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

· Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 52

<211> 125

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

· <223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 52

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

·

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 53
<211> 125
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 53

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr

```

100                               105                               110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115                               120                               125

<210> 54
<211> 125
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 54

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

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

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50                               55                               60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100                              105                              110

-----
Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115                               120                               125

```

```

<210> 55
<211> 125
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 55

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20              25              30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50              55              60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100             105             110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115             120             125

<210> 56
<211> 125
<212> PRT

```

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 56

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 57

<211> 125

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 57

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 58

<211> 122

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 58

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Ala Ile Ser Glu Tyr Ser Asn Thr Tyr Cys Ser Asp Ser Val Arg
50 55 60

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

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

Ala Ser Pro Thr Ile Leu Leu Thr Thr Glu Gln Trp Tyr Lys Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 59
<211> 126
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 59

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

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

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

Ala Ala Ile Asn Trp Ser Gly Leu Ser Thr Phe Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Gly Arg Ile Pro Ser Ser Ser Arg Phe Ser Ser Pro Ala Ala
100 105 110

Tyr Ala Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 60
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 60

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Thr Ser Ile Tyr Thr Ile Thr
20 25 30

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

Ala Ala Ile Thr Trp Ser Ala Pro Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Arg Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Asp Arg Phe Lys Gly Arg Ser Ile Val Thr Pro Ser Asp Tyr
100 105 110

Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 61
<211> 111
<212> PRT
<213> Lama glama

<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 Ser Ala Val Gly Asp Ile
20 25 30

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

Ala Thr Ile Thr Pro Ser Gly Tyr Thr Tyr Trp Asp Phe Val Lys
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Thr Gln Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 62
<211> 128

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 62

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Asp Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Arg Ser Arg Pro Leu Gly Ala Gly Ala Trp Tyr Ser Gly Glu
100 105 110

Lys His Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 63

<211> 121

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 63

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Phe Ser His Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ser Ile Arg Gly Gly Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Asn Ser Val
50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ala Thr Ala Phe Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 64
<211> 113
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 64

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 Val Ala Ser Gly Ile Arg Phe Met Ser Met
20 25 30

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

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

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

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

Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Ala Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 65
<211> 116
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 65

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 Asn Ile Phe Ser Asn Asn
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

```

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

Asn Ala Ala Tyr Arg Thr Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
      100                    105                    110

Thr Val Ser Ser
      115

<210> 66
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 66

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1                      5                      10                      15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Thr Ser Ile Tyr Ser Ile Thr
      20                      25                      30

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

Ala Ala Ile Thr Trp Ser Ala Pro Ser Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50                      55                      60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95

Ala Ala Asp Arg Phe Lys Gly Arg Ser Ile Val Thr Arg Ser Asp Tyr
      100                    105                    110

```


Lys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 67

<211> 125

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 67

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Thr Ser Ile Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

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

Ala Ala Ile Thr Trp Ser Ala Pro Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Thr Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Asp Arg Phe Lys Gly Arg Ser Ile Val Thr Arg Ser Asp Tyr
100 105 110

Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 68

<211> 126

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 68

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

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

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

Ser Ala Ile Asn Gln Arg Gly Ser Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser Val Phe
65 70 75 80

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

Ala Ala Ser Thr Trp Tyr Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Arg Arg Glu Glu
100 105 110

Tyr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 69

<211> 123

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 69

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Phe Ser Asp Asn
20 25 30

Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Ala Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala His Ile Ser Arg Gly Gly Ser Arg Thr Glu Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Thr Ala Arg Pro Tyr Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 70
<211> 121
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 70

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Trp Asn Lys Ile Ser Thr Ile Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ala Ser Arg Pro Thr Leu Arg Ile Pro Gln Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 71
<211> 115
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 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 Ser Ile Val Arg Ser Asp
20 25 30

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

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

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

Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Ala Arg Phe Ser Gly Glu Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 72
<211> 124
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 72

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Arg Glu Arg Glu Phe Leu
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Val Asn
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Arg Gln Trp Gly Gly Thr Tyr Tyr Tyr His Gly Ser Tyr Ala

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 73
<211> 113
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 73

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 Val Ala Ser Gly Ile Arg Phe Met Ser Met
20 25 30

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

Ile Ser Ser Glu Gly Thr Thr Ala Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

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

Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 74
<211> 128
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 74

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Asp Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Arg Ser Arg Pro Leu Gly Ala Gly Ala Trp Tyr Thr Gly Glu
100 105 110

Thr Arg Tyr Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 75

<211> 122

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 75

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Ser Phe Ser Arg Tyr

```

                20                25                30

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

Ile Ala Ile Ser Glu Tyr Asp Asn Val Tyr Thr Ala Asp Ser Val Arg
      50                55                60

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

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

Ala Ser Pro Thr Ile Leu Leu Ser Thr Asp Glu Trp Tyr Lys Tyr Trp
      100                105                110

Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
      115                120

<210> 76
<211> 128
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 76

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1                5                10                15

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

Asp Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
      35                40                45

Ala Val Ile Arg Trp Ser Thr Gly Gly Thr Tyr Thr Ser Asp Ser Val

```


50

55

60

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

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

Ala Ala Arg Ser Arg Pro Leu Gly Ala Gly Ala Trp Tyr Thr Gly Glu
100 105 110

Thr Arg Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 77

<211> 127

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 77

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Arg Ala Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Arg Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Val Ile Thr Arg Ser Pro Ser Asn Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

```

                                     85                               90                               95

Ala Ala His Tyr Trp Asn Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Thr Asp Ser Arg
      100                               105                               110

Trp Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
      115                               120                               125

<210> 78
<211> 124
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 78

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1                               5                               10                               15

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

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

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

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

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

Ala Ala Ser Ala Trp Trp Tyr Ser Gln Met Ala Arg Asp Asn Tyr Arg
      100                               105                               110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

```

115

120

<210> 79
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

. <400> 79

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Thr Leu Ser Arg Tyr
20 25 30

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

. Ala Ser Ile Asn Thr Ser Gly Lys Arg Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Met
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Gly Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ala Asp Arg Phe Phe Gly Ser Asp Ser Asn Glu Pro Arg Ala Tyr
100 105 110

Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 80
<211> 123
-----<212> PRT-----
<213> Lama glama

<400> 80

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Thr Ile Arg His His Gly Tyr Asp Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Ser Cys
85 90 95

Ala Lys Lys Leu Phe Trp Asp Met Asp Pro Lys Thr Gly Phe Ser Ser
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 81

<211> 126

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 81

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Val Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Lys Met Asn Ser Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Lys Val Arg Asn Phe Asn Ser Asp Trp Asp Leu Leu Thr Ser
100 105 110

Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 82
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 82

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Met Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ala Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Arg Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Arg Ile Ser Trp Ser Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Gly Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Gln Thr Thr Ser Lys Tyr Asp Asn Tyr Asp Ala Arg Ala Tyr
100 105 110

Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 83
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 83

Glu Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Met Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ala Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Arg Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Arg Ile Ser Trp Ser Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Gly Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Gln Thr Thr Ser Lys Tyr Asp Asn Tyr Asp Ala Arg Ala Tyr
100 105 110

Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 84
<211> 123
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 84

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Asn
65 70 75 80

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

Ala Ala Asp Pro Phe Tyr Ser Tyr Gly Ser Pro Ser Pro Tyr Arg Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

```

<210> 85
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 85

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 Ser Ser Gly Arg Leu Phe Ser Phe Ser
          20          25          30

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

Ala Ala Phe Lys Trp Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Tyr Val
          50          55          60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
          85          90          95

Ala Val Asp Arg Phe Tyr Thr Gly Arg Tyr Tyr Ser Ser Asp Glu Tyr
          100          105          110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
          115          120          125

<210> 86
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 86

```


Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Thr Ser Ile Tyr Ser Ile Thr
20 25 30

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

Ala Ala Ile Thr Trp Ser Ala Pro Ser Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Val Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Asp Arg Phe Lys Gly Arg Ser Ile Val Thr Arg Ser Asp Tyr
100 105 110

Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 87

<211> 125

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 87

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

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

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

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

Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Leu Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Ser Val Phe Tyr Ser Thr Ala Leu Thr Arg Pro Val Asp Tyr
100 105 110

Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 88
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 88

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Thr Ser Ile Tyr Ser Ile Thr
20 25 30

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

Ala Ala Ile Thr Trp Ser Ala Pro Thr Thr Tyr Ser Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Asp Arg Phe Lys Gly Arg Ser Ile Val Thr Arg Ser Asp Tyr
100 105 110

Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 89
<211> 129
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 89

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Val Thr Gly Arg Thr Phe Asn Lys Tyr
20 25 30

Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Asn Asp Arg Glu Phe Val
35 40 45

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

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

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

```

Ala Ile Asp Glu Asp Leu Tyr His Tyr Ser Ser Tyr His Phe Thr Arg
      100              105              110
;
Val Asp Leu Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
      115              120              125
;
Ser

<210> 90
<211> 117
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 90
;
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1              5              10              15
;
Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Ser
      20              25              30
;
Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35              40              45
;
Ser Arg Ile Ser Pro Gly Gly Leu Phe Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
      50              55              60
;
Lys Gly Arg Phe Ser Val Ser Thr Asp Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr
      65              70              75              80
;
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Ser Cys
      85              90              95
;
Ala-Lys Gly-Gly-Ala-Pro Asn Tyr Thr Pro Arg Gly Arg Gly Thr Gln
      100              105              110

```

```

Val Thr Val Ser Ser
      115

<210> 91
<211> 115
<212> PRT
<213> Lama glama

<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 Ser Ile Val Arg Ser Asp
      20              25              30

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

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

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

Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
      85              90              95

Ala Arg Phe Ser Gly Glu Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr
      100             105             110

Val Ser Ser
      115

-----
<210> 92
<211> 129
<212> PRT

```

<213> Lama glama

<400> 92

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Asn Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ile Asp Glu Asp Leu Tyr His Tyr Ser Ser Tyr His Tyr Thr Arg
100 105 110

Val Ala Leu Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 93

<211> 124

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 93

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Asp
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Asn Thr Phe Gly Leu Tyr
20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Arg Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Val Asn
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Arg Gln Trp Gly Gly Thr Tyr Tyr Tyr His Gly Ser Tyr Ala
100 105 110

Trp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 94

<211> 128

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 94

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Glu Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Asp Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Arg Ser Arg Pro Leu Gly Ala Gly Ala Trp Tyr Thr Gly Glu
100 105 110

Asn Tyr Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 95
<211> 126
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 95

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Ser Gly Arg Ile Trp Arg Ser Arg Asp Tyr Asp Ser Glu Lys Tyr
100 105 110

Tyr Asp Ile Trp Gly His Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 96
<211> 129
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 96

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Val Ile Ser Trp Thr Asn Ser Met Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Val Asp Arg Arg Arg Thr Tyr Ser Arg Trp Arg Phe Tyr Thr Gly
100 105 110

Val Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 97
<211> 129
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 97

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

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

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

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

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Val Asp Arg Arg Arg Ala Tyr Ser Arg Trp Arg Tyr Tyr Thr Gly
100 105 110

Val Asn Asp Tyr Glu Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 98

<211> 129

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 98

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Val Asp Arg Arg Arg Leu Tyr Ser Arg Trp Arg Tyr Tyr Thr Gly
100 105 110

Val Asn Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 99

<211> 129

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 99

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ala Lys Asn Thr Val Ser
65 70 75 80

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

Ala Val Asp Arg Arg Arg Thr Tyr Ser Arg Trp Arg Tyr Tyr Thr Gly
100 105 110

Val Asn Glu Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 100
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 100

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ala Lys Asn Thr Val Ser
 65 70 75 80

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

Ala Ala Asp Arg Arg Arg Thr Tyr Ser Arg Trp Arg Tyr Tyr Thr Gly
 100 105 110

Val Asn Glu Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 101
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 101

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ala Gly Pro Ile Ala Pro Ser Pro Arg Pro Arg Glu Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 102

<211> 129

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 102

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ala Tyr

```

                20                25                30
Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
      35                40                45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ala Lys Asn Thr Val Ser
      65                70                75                80

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

Ala Val Asp Arg Arg Arg Thr Tyr Ser Arg Trp Arg Tyr Tyr Thr Gly
                100                105                110

Val Asn Glu Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
      115                120                125

Ser

<210> 103
<211> 129
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 103

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1                5                10                15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ala Tyr
      20                25                30
-----
Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

```

```

35              40              45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Gln Phe
65              70              75              80

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

Ala Val Gly Arg Arg Arg Ala Tyr Ser Arg Trp Arg Tyr Tyr Thr Gly
100             105             110

Val Asn Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115             120             125

Ser

<210> 104
<211> 125
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 104

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

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

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

-----

Ala His Ile Asn Arg Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

```



```

50              55              60

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

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

Ala Ala Gly Arg Tyr Tyr Ser Ser Asp Gly Val Pro Ser Ala Ser Phe
      100              105              110

Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
      115              120              125

<210> 105
<211> 128
<212> PRT
. <213> Lama glama

<400> 105

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Phe Thr Ser Ala Arg Thr Phe Asp Thr Trp
      20              25              30

Ala Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Ile
      35              40              45

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

Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Thr Leu Phe
65              70              75              80
-----
Leu Gln Met Asn Asn Thr Ala Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

```

```

                        85                        90                        95
Ala Ala Lys Thr Val Asp Tyr Cys Ser Ala Tyr Glu Cys Tyr Ala Arg
      100                        105                        110

Leu Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Ala Gln Val Thr Val Ser Ser
      115                        120                        125

<210> 106
<211> 126
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 106

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

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

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Gly Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
      35          40          45

Ala Ala Ile Thr Leu Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ala Val Lys
      50          55          60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly
      85          90          95

Ala Asp Pro Ser Tyr Tyr Ser Thr Ser Arg Tyr Thr Lys Ala Thr Glu
      100         105         110

-----

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

```

115

120

125

<210> 107

<211> 126

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 107

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Thr Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Ile Arg Trp Thr Val Asn Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Gln Thr Ser Ala Pro Arg Ser Leu Ile Arg Met Ser Asn Glu
100 105 110

Tyr Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 108

<211> 123

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 108

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Thr Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Arg Ser Gly Ser Asn Arg Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Asp
65 70 75 80

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

Ala Ala Thr Ser Arg Gly Leu Ser Ser Leu Ala Gly Glu Tyr Asn Tyr
100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 109

<211> 123

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 109

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Arg Met Gly Trp Phe Arg Arg Thr Pro Gly Lys Glu Asp Glu Phe Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Lys Ala Lys Asn Ala Gly Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Gly Ala Gln Ser Asp Arg Tyr Asn Ile Arg Ser Tyr Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 110
<211> 115
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 110

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

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

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

Ser Ser Ile Pro Pro Val Gly His Phe Ala Asn Tyr Ala Pro Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Ser Ala Gly Arg Thr Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 111
<211> 124
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 111

Lys Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Ala Thr Arg Ser Ser Thr Ile Val Val Gly Val Gly Gly Met Glu
100 105 110

Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 112

<211> 128

<212> PRT

* <213> Lama glama

<400> 112

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Asp Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Asn Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

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

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

Leu Gln Ile Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Val Asp Thr Gln Asp Leu Gly Leu Asp Ile Phe Cys Arg Gly Asn
100 105 110

Gly Pro Phe Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 113
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 113

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Asn Leu Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Tyr Asp Ser Val Thr Tyr Tyr Ala Asp His Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Ser Ile Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Glu Arg Glu Gln Leu Arg Arg Arg Glu Ser Pro His Asp Glu
 100 105 110

Leu Leu Arg Leu Cys Phe Tyr Gly Met Arg Tyr Ser Gly Lys Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser
 130

<210> 114
 <211> 123

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 114

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 Val Ala Ser Gly Phe Arg Leu Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ala Val
35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Ser Asp Thr Ser Ile Asp Tyr Thr Asn Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ala Ala Phe Arg Cys Ser Gly Tyr Glu Leu Arg Gly Phe Pro Thr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 115

<211> 126

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 115

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

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

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ala Asp Arg Ser Pro Asn Ile Ile Asn Val Val Thr Ala Tyr Glu
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 116
<211> 126
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 116

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

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

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Ile Thr Ser Ser Pro Met Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Val Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ala Pro Glu Gly Ser Phe Arg Arg Gln Tyr Ala Asp Arg Ala Met
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 117
<211> 127
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 117

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Asp Met Gly Trp Phe Arg Gln Ser Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ile Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Arg Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Leu Ala Leu Ala Asp Arg Gly
100 105 110

Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 118

<211> 125

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 118

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ala Val
35 40 45

Ser Cys Met Ser Ala Gly Asp Ser Ile Pro Trp Tyr Thr Ala Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Thr Ser Thr Asp Asn Ala Arg Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala His Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Arg Tyr His Gly Asp Tyr Cys Tyr Tyr Glu Gly Tyr Tyr
100 105 110

```

Pro Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
      115                120                125

<210> 119
<211> 117
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 119

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1              5              10              15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Thr Ser Ile Ser Ser Thr Asn
      20                25                30

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

Ala Thr Ile Thr Ser Ser Ser Ile Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys
      50                55                60

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

Gln Met Thr Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His
      85              90              95

Ala Arg Trp Arg Trp Ser Asp Val Glu Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Leu
      100             105             110

Val Thr Val Ser Ser
      115

<210> 120
<211> 121
<212> PRT

```

<213> Lama glama

<400> 120

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

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

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

Ala Ser Ile Thr Arg Ser Ser Ile Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Pro Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Ser Leu
65 70 75 80

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

Ala Ala Ile Arg Pro Glu Leu Tyr Ser Val Val Asn Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 121

<211> 127

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 121

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

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

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

Ala Val Ile Ser Trp Arg Asp Ser Phe Ala Tyr Tyr Ala Glu Pro Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Arg Val Ser Ser Arg Leu Val Leu Pro Asn Thr Ser Pro
100 105 110

Asp Phe Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 122

<211> 129

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 122

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

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

Ile Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Met Asn Trp Arg Gly Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Phe Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Asp Glu Asp Leu Tyr His Tyr Ser Ser Tyr His Tyr Ser Arg
100 105 110

Val Asp Leu Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 123
<211> 121
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 123

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

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

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

Ala Ser Ile Thr Arg Ser Ser Ile Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Ser Leu
65 70 75 80

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

Ala Ala Ile Arg Pro Glu Leu Tyr Ser Val Val Asn Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 124
<211> 123
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 124

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Pro Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Phe Thr Arg Ser Ser Asn Ile Pro Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Val Asn Leu Gly Ser Thr Trp Ser Arg Asp Gln Arg Thr Tyr Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 125
<211> 113
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 125

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Arg Phe Met Ser Met
20 25 30

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

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

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

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

Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 126
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Штучна

<220>
 <223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 126

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Arg Phe Ile Ser Met
 20 25 30

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

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

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
 65 70 75 80

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

Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Ala Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 127
 <211> 113

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 127

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Arg Phe Ile Ser Met
20 25 30

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

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

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

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

Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 128

<211> 285

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 128

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp
165 170 175

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
180 185 190

Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
195 200 205

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
210 215 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
225 230 235 240

Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
245 250 255

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
260 265 270

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280 285

<210> 129
<211> 245
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 129

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

```

      35              40              45

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
  50              55              60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
      100              105              110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
      115              120              125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
      130              135              140

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
      145              150              155              160

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

Ile Gln Arg Gln Leu Val Ala Thr Ile Thr Pro Ser Gly Tyr Thr Tyr
      180              185              190

Tyr Trp Asp Phe Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
      195              200              205

Lys Asn Ile Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
      210              215              220

```

Ala Ala Tyr Tyr Cys Asn Thr Gln Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 130
<211> 255
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 130

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly


```

115              120              125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130              135              140

Leu Ala Gln Ala Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145              150              155              160

Arg Ser Phe Ser His Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
165              170              175

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ser Ile Arg Gly Gly Gly Gly Ser Thr
180              185              190

Thr Tyr Ala Asn Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn
195              200              205

Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
210              215              220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Thr Ala Phe Tyr Arg Gly Pro Tyr
225              230              235              240

Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245              250              255

<210> 131
<211> 247
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 131
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp
1              5              10              15

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly
145 150 155 160

Ile Arg Phe Met Ser Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys His
165 170 175

Arg Glu Leu Val Ala Arg Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Val
180 185 190

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

```

195                               200                               205

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val
210                               215                               220

Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Ala Gly
225                               230                               235                               240

- Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 132
<211> 250
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 132

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20                               25                               30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50                               55                               60

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

-----
Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85                               90                               95

```

```

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
      100                      105                      110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
      115                      120                      125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
      130                      135                      140

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
      145                      150                      155                      160

Asn Ile Phe Ser Asn Asn Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly
      165                      170                      175

Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Arg Ile Ser Ser Gly Gly Gly Phe Thr
      180                      185                      190

Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn
      195                      200                      205

Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
      210                      215                      220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Ala Tyr Arg Thr Tyr Asn Tyr Trp
      225                      230                      235                      240

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
      245                      250

```

```

<210> 133
<211> 258
<212> PRT
<213> Штучна

```

<220>

<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 133

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Arg Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

Lys Glu Arg Val Leu Val Ala Asp Ile Ser Ser Ser Gly Ile Asn Thr
180 185 190

Tyr Val Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
195 200 205

Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ala Trp Trp Tyr Ser Gln Met
225 230 235 240

Ala Arg Asp Asn Tyr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
245 250 255

Ser Ser

<210> 134

<211> 251

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 134

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

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

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Ser Pro Gly Gly Leu Phe Thr
180 185 190

Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Ser Val Ser Thr Asp Asn
195 200 205

Ala Asn Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Leu Tyr Ser Cys Ala Lys Gly Gly Ala Pro Asn Tyr Thr Pro
225 230 235 240

Arg Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 135
<211> 259
<212> PRT
<213> Штучна

<220>

<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 135

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

----Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly-----
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Ala Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly
145 150 155 160

Arg Thr Phe Asn Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

Lys Glu Arg Glu Ser Val Ala His Ile Asn Arg Ser Gly Ser Ser Thr
180 185 190

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
195 200 205

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Arg Tyr Tyr Ser Ser Asp Gly
225 230 235 240

Val Pro Ser Ala Ser Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
245 250 255

Val Ser Ser

<210> 136

<211> 257

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 136

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Thr	Gly	Asp	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Glu	Val	Ser	Gly	Arg	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	20	25	30	
Ser	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Gln	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val	35	40	45	
Val	Ala	Ile	Ser	Lys	Gly	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Asp	Ser	Val	Ser	Leu	Glu	50	55	60	
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	65	70	75	80
Gln	Ile	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	85	90	95	
Ser	Ser	Arg	Ala	Tyr	Gly	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Leu	Ala	Asp	Thr	Tyr	100	105	110	
Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	115	120	125	
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	130	135	140	
Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	145	150	155	160
Ser	Ala	Phe	Lys	Ser	Tyr	Arg	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Arg	Thr	Pro	Gly	165	170	175	
Lys	Glu	Asp	Glu	Phe	Val	Ala	Ser	Ile	Ser	Trp	Thr	Tyr	Gly	Ser	Thr	180	185	190	

Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Lys
195 200 205

Ala Lys Asn Ala Gly Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Ala Gln Ser Asp Arg Tyr Asn
225 230 235 240

Ile Arg Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
245 250 255

Ser

<210> 137
<211> 249
<212> PRT
<213> Штучна

<220>

* <223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 137

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

```

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
      100              105              110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
      115              120              125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
      130              135              140

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly
145              150              155              160

Phe Thr Phe Ser Thr Ser Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
      165              170              175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Pro Pro Val Gly His Phe Ala
      180              185              190

Asn Tyr Ala Pro Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
      195              200              205

Ala Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp
      210              215              220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ser Ala Gly Arg Thr Lys Gly
225              230              235              240

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser .....
      245

```

```

<210> 138
<211> 258
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 138

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
          50          55          60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
          100          105          110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
          115          120          125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130          135          140

```

Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu
145 150 155 160

Arg Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Asp Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Arg Ser Gly Gly Gly Thr
180 185 190

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
195 200 205

Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Thr Arg Ser Ser Thr Ile Val Val
225 230 235 240

Gly Val Gly Gly Met Glu Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val
245 250 255

Ser Ser

<210> 139

<211> 276

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 139

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp

: 1-----5-----10-----15-----

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
      20              25              30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
      50              55              60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
      100             105             110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
      115             120             125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
      130             135             140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
      145             150             155             160

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
      165             170             175

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser
      180             185             190

Ala Val Gly Asp Ile Thr Val Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Ile
      195             200             205

```

Gln Arg Gln Leu Val Ala Thr Ile Thr Pro Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr
210 215 220

Trp Asp Phe Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
225 230 235 240

Asn Ile Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
245 250 255

Ala Tyr Tyr Cys Asn Thr Gln Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
260 265 270

Thr Val Ser Ser
275

<210> 140

<211> 286

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 140

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu.....
50 55 60


```

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

, Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                      85                      90                      95

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
                      100                      105                      110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
                      115                      120                      125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
                      130                      135                      140

-
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145                      150                      155                      160

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
                      165                      170                      175

Ala Gln Ala Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg
                      180                      185                      190

Ser Phe Ser His Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
-                      195                      200                      205

Glu Arg Glu Phe Val Ala Ser Ile Arg Gly Gly Gly Gly Ser Thr Thr
                      210                      215                      220

Tyr Ala Asn Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala
225                      230                      235                      240

-----
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
                      245                      250                      255

-

```

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Thr Ala Phe Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp
260 265 270

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280 285

<210> 141

<211> 278

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 141

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

```

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
    115                      120                      125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
    130                      135                      140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    145                      150                      155                      160

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
    165                      170                      175

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile
    180                      185                      190

Arg Phe Met Ser Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys His Arg
    195                      200                      205

Glu Leu Val Ala Arg Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Ala Tyr Val Asp
    210                      215                      220

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
    225                      230                      235                      240

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
    245                      250                      255

Tyr Cys Asn Thr Phe Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Ala Gly Thr
    260                      265                      270

Gln Val Thr Val Ser Ser
    275

```

<210> 142

<211> 281
 <212> PRT
 <213> Штучна

<220>

<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 142

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
 50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
 100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
165 170 175

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asn
180 185 190

Ile Phe Ser Asn Asn Ala Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys
195 200 205

Gln Arg Glu Leu Val Ala Arg Ile Ser Ser Gly Gly Gly Phe Thr Tyr
210 215 220

Tyr Leu Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala
225 230 235 240

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
245 250 255

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Ala Tyr Arg Thr Tyr Asn Tyr Trp Gly
260 265 270

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 143
<211> 289
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 143

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
165 170 175

Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg
180 185 190

Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys

195

200

205

Glu Arg Val Leu Val Ala Asp Ile Ser Ser Ser Gly Ile Asn Thr Tyr
210 215 220

Val Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
225 230 235 240

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
245 250 255

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ala Trp Trp Tyr Ser Gln Met Ala
260 265 270

Arg Asp Asn Tyr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
275 280 285

Ser

<210> 144

<211> 282

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 144

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35	40	45
Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu		
50	55	60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu		
65	70	75 80
Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
85	90	95
Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr		
100	105	110
Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly		
115	120	125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
130	135	140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
145	150	155 160
Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu		
165	170	175
Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe		
180	185	190
Thr Leu Ser Ser Ser Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys		
195	200	205
Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Ser Pro Gly Gly Leu Phe Thr Tyr		
210	215	220

Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Ser Val Ser Thr Asp Asn Ala
225 230 235 240

Asn Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
245 250 255

Ala Leu Tyr Ser Cys Ala Lys Gly Gly Ala Pro Asn Tyr Thr Pro Arg
260 265 270

Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 145

<211> 290

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 145

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

```

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
      100                      105                      110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
      115                      120                      125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
      130                      135                      140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
      145                      150                      155                      160

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
      165                      170                      175

Val Gln Ala Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Arg
      180                      185                      190

Thr Phe Asn Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
      195                      200                      205

Glu Arg Glu Ser Val Ala His Ile Asn Arg Ser Gly Ser Ser Thr Tyr
      210                      215                      220

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
      225                      230                      235                      240

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
      245                      250                      255

--Ala-Val-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Ala-Gly-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ser-Asp-Gly-Val-----
      260                      265                      270

```

Pro Ser Ala Ser Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
275 280 285

Ser Ser
290

<210> 146
<211> 288
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 146

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly		
115	120	125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
130	135	140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
145	150	155 160
Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu		
165	170	175
Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Ser		
180	185	190
Ala Phe Lys Ser Tyr Arg Met Gly Trp Phe Arg Arg Thr Pro Gly Lys		
195	200	205
Glu Asp Glu Phe Val Ala Ser Ile Ser Trp Thr Tyr Gly Ser Thr Phe		
210	215	220
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Lys Ala		
225	230	235 240
Lys Asn Ala Gly Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr		
245	250	255
Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Ala Gln Ser Asp Arg Tyr Asn Ile		
260	265	270
Arg Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser		
275	280	285
<hr/>		
<210>	147	
<211>	280	
<212>	PRT	

<213> Штучна

<220>

<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 147

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

~~Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser~~
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
165 170 175

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe
180 185 190

Thr Phe Ser Thr Ser Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
195 200 205

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Pro Pro Val Gly His Phe Ala Asn
210 215 220

Tyr Ala Pro Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
225 230 235 240

Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr
245 250 255

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

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 148
<211> 289
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 148

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
165 170 175

Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg
180 185 190

Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Asp Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
195 200 205

Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Arg Ser Gly Gly Gly Thr Tyr
210 215 220

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
225 230 235 240

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
245 250 255

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Thr Arg Ser Ser Thr Ile Val Val Gly
260 265 270

Val Gly Gly Met Glu Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
275 280 285

Ser

<210> 149
<211> 245
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 149

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 Ser Ala Val Gly Asp Ile
20 25 30

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

Ala Thr Ile Thr Pro Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Trp Asp Phe Val Lys
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Thr Gln Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val
130 135 140

Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala
145 150 155 160

Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr
165 170 175

Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp
180 185 190

Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser
210 215 220

Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 150
<211> 255
<212> PRT
<213> Штучна

<220>

<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 150

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Phe Ser His Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ser Ile Arg Gly Gly Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Asn Ser Val
50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ala Thr Ala Phe Tyr Arg Gly Pro Tyr Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr
130 135 140

Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser
145 150 155 160

Ser Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu
165 170 175

Phe Val Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser
180 185 190

Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val
195 200 205

Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
210 215 220

Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp
225 230 235 240

Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245 250 255

<210> 151
<211> 247
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 151

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Arg Phe Met Ser Met
20 25 30

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

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

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

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

Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Ala Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys
130 135 140

Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg
145 150 155 160

Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Val Ala Ile Ser Lys Gly
165 170 175

Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser
180 185 190

Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys

```

195                200                205

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly
210                215                220

Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
225                230                235                240

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 152
<211> 250
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 152

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 Asn Ile Phe Ser Asn Asn
20                25                30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65                70                75                80

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

```

Asn Ala Ala Tyr Arg Thr Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
115 120 125

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp Ser Leu Arg
130 135 140

Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Gly
145 150 155 160

Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Val Ala Ile
165 170 175

Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu Gly Arg Phe
180 185 190

Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn
195 200 205

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

Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp
225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 153

<211> 258

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 153

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Ala Ser Ala Trp Trp Tyr Ser Gln Met Ala Arg Asp Asn Tyr Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
130 135 140

Val Gln Thr Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg
145 150 155 160

Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys
165 170 175

Glu Arg Glu Phe Val Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp
180 185 190

Ser Val Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys
195 200 205

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg
225 230 235 240

Leu Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
245 250 255

Ser Ser

<210> 154
<211> 251
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 154

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Ser Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Gly Ala Pro Asn Tyr Thr Pro Arg Gly Arg Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val
115 120 125

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp Ser Leu
130 135 140

Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met
145 150 155 160

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Val Ala
165 170 175

Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu Gly Arg
180 185 190

Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Ile
195 200 205

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

Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr

225 230 235 240

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 155
<211> 259
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 155

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

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

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

Ala His Ile Asn Arg Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Gly Arg Tyr Tyr Ser Ser Asp Gly Val Pro Ser Ala Ser Phe
100 105 110

Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

```

115              120              125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130              135              140

Leu Val Gln Thr Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly
145              150              155              160

Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly
165              170              175

Lys Glu Arg Glu Phe Val Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr
180              185              190

Asp Ser Val Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala
195              200              205

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
210              215              220

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu
225              230              235              240

Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
245              250              255

Val Ser Ser

```

```

<210> 156
<211> 257
<212> PRT
<213> Штучна

```

```

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

```

<400> 156

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Arg Met Gly Trp Phe Arg Arg Thr Pro Gly Lys Glu Asp Glu Phe Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Lys Ala Lys Asn Ala Gly Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Gly Ala Gln Ser Asp Arg Tyr Asn Ile Arg Ser Tyr Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
130 135 140

Gln Thr Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr
145 150 155 160

Phe Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu
165 170 175

Arg Glu Phe Val Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser
180 185 190

Val Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn
195 200 205

Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu
225 230 235 240

Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
245 250 255

Ser

<210> 157
<211> 249
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 157

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

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

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

Ser Ser Ile Pro Pro Val Gly His Phe Ala Asn Tyr Ala Pro Ser Val

50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe		
65	70	75 80
.		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85 90	95
Ala Lys Asp Ser Ala Gly Arg Thr Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr		
	100 105	110
Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu		
	115 120	125
.		
Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp Ser Leu Arg Leu		
	130 135	140
Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp		
	145 150	155 160
Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Val Ala Ile Ser		
	165 170	175
Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr		
	180 185	190
.		
Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser		
	195 200	205
Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala		
	210 215	220
Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly		
225	230	235 240

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 158
<211> 258
<212> PRT
<213> Штучна

<220>

<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 158

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Ala Thr Arg Ser Ser Thr Ile Val Val Gly Val Gly Gly Met Glu
100 105 110

Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
130 135 140

Val Gln Thr Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg
145 150 155 160

Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys
165 170 175

Glu Arg Glu Phe Val Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp
180 185 190

Ser Val Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys
195 200 205

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg
225 230 235 240

Leu Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
245 250 255

Ser Ser

<210> 159

<211> 276

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 159

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly


```

1           5           10           15
.
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ala Val Gly Asp Ile
      20           25           30

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

Ala Thr Ile Thr Pro Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Trp Asp Phe Val Lys
      50           55           60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ile Val Tyr Leu
65           70           75           80
.
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Asn
      85           90           95

Thr Gln Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
      100          105          110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
      115          120          125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
      130          135          140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
145          150          155          160

Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser
      165          170          175

Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln
180-----185-----190-----
.

```

Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys
195 200 205

Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn
210 215 220

Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
225 230 235 240

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg
245 250 255

Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
260 265 270

Thr Val Ser Ser
275

<210> 160
<211> 286
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 160

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Phe Ser His Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala	Ser	Ile	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Thr	Tyr	Ala	Asn	Ser	Val	50	55	60	
Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Glu	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Ala	Thr	Ala	Phe	Tyr	Arg	Gly	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	100	105	110	
Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	115	120	125	
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	130	135	140	
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	145	150	155	160
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Thr	Gly	165	170	175	
Asp	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Glu	Val	Ser	Gly	Arg	Thr	Phe	Ser	Ser	180	185	190	
Tyr	Ser	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Gln	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	195	200	205	
Val	Val	Ala	Ile	Ser	Lys	Gly	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Asp	Ser	Val	Ser	Leu	210	215	220	
Glu	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	225	230	235	240

Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
245 250 255

Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr
260 265 270

Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280 285

<210> 161
<211> 278
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 161

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 Val Ala Ser Gly Ile Arg Phe Met Ser Met
20 25 30

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

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

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

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

Ser Ser Arg Pro Asn Pro Trp Gly Ala Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
145 150 155 160

Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu
165 170 175

Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln
180 185 190

Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly
195 200 205

Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys
210 215 220

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro
225 230 235 240

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser
245 250 255

Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
260 265 270

Gln Val Thr Val Ser Ser
275

<210> 162
 <211> 281
 <212> PRT
 <213> Штучна

<220>
 <223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 162

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 Asn Ile Phe Ser Asn Asn
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Asn Ala Ala Tyr Arg Thr Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly.....
 130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
145 150 155 160

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp Ser Leu Arg Leu
165 170 175

Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp
180 185 190

Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Val Ala Ile Ser
195 200 205

Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr
210 215 220

Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser
225 230 235 240

Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala
245 250 255

Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly
260 265 270

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 163
<211> 289
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 163

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1           5           10           15

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

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

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

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

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

Ala Ala Ser Ala Trp Trp Tyr Ser Gln Met Ala Arg Asp Asn Tyr Arg
100          105          110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
115          120          125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130          135          140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
145          150          155          160

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
165          170          175

Gln Thr Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr
180          185          190

```


Phe Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu
195 200 205

Arg Glu Phe Val Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser
210 215 220

Val Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn
225 230 235 240

Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
245 250 255

Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu
260 265 270

Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
275 280 285

Ser

<210> 164
<211> 282
<212> PRT
<213> Штучна

<220>

<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 164

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Ser Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Gly Ala Pro Asn Tyr Thr Pro Arg Gly Arg Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145 150 155 160

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp Ser Leu Arg
165 170 175

Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Gly
180 185 190

Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Val Ala Ile
195 200 205

Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu Gly Arg Phe

210 215 220

Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn
225 230 235 240

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Arg
245 250 255

Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp
260 265 270

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 165
<211> 290
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 165

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

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

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

Ala His Ile Asn Arg Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr

65		70		75		80									
Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Ala	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Ala	Ser	Phe
		100						105				110			
Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly
	115						120					125			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
	130					135					140				
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
145					150					155					160
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu
			165					170						175	
Val	Gln	Thr	Gly	Asp	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Glu	Val	Ser	Gly	Arg
			180					185					190		
Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ser	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Gln	Gly	Lys
	195						200					205			
Glu	Arg	Glu	Phe	Val	Val	Ala	Ile	Ser	Lys	Gly	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Asp
	210					215				220					
Ser	Val	Ser	Leu	Glu	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ala	Lys
225					230					235				240	
Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Ile	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala
			245						250				255		

Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg
260 265 270

Leu Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
275 280 285

Ser Ser
290

<210> 166
<211> 288
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 166

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Arg Met Gly Trp Phe Arg Arg Thr Pro Gly Lys Glu Asp Glu Phe Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Lys Ala Lys Asn Ala Gly Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

```

Ala Ala Gly Ala Gln Ser Asp Arg Tyr Asn Ile Arg Ser Tyr Asp Tyr
      100                      105                      110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
      115                      120                      125

- Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
      130                      135                      140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
      145                      150                      155                      160

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
      165                      170                      175

Thr Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe
      180                      185                      190

Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg
      195                      200                      205

Glu Phe Val Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val
      210                      215                      220

Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr
      225                      230                      235                      240

Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
      245                      250                      255

Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala
      260                      265                      270

- Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser -----
      275                      280                      285

```

<210> 167
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> Штучна

<220>
 <223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 167

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

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

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

Ser Ser Ile Pro Pro Val Gly His Phe Ala Asn Tyr Ala Pro Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Ser Ala Gly Arg Thr Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
145 150 155 160

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser
165 170 175

Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp Phe
180 185 190

Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Val Ala Ile Ser Lys
195 200 205

Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser Val Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile
210 215 220

Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu
225 230 235 240

Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr
245 250 255

Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln
260 265 270

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 168
<211> 289
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Штучний поліпептид, що містить послідовності Lama glama

<400> 168


```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1           5           10           15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Thr Phe Ser Asn Tyr
20           25           30

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

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

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

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

Ala Ala Thr Arg Ser Ser Thr Ile Val Val Gly Val Gly Gly Met Glu
100          105          110

Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
115          120          125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130          135          140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
145          150          155          160

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
165          170          175

-----
Gln Thr Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Arg Thr
180          185          190

```

Phe Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu
195 200 205

Arg Glu Phe Val Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ser
210 215 220

Val Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn
225 230 235 240

Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val
245 250 255

Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu
260 265 270

Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
275 280 285

Ser

<210> 169
<211> 35
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Синтетичний лінкер

<400> 169

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

~~Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly~~
20 25 30

Gly Gly Ser
35

<210> 170
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Синтетичний лінкер

<400> 170

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 171
<211> 40
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Синтетичний лінкер

<400> 171

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40

<210> 172
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна

<220>

<223> Синтетичний лінкер

<400> 172

Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 173

<211> 25

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Синтетичний лінкер

<400> 173

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 174

<211> 27

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Синтетичний лінкер

<400> 174

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
20 25

<210> 175

<211> 35

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Синтетичний лінкер

<400> 175

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

<210> 176

<211> 35

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Синтетичний лінкер

<400> 176

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

<210> 177

<211> 115

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 177

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

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

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

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

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

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 178

<211> 585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 178

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

```

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
      20              25              30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
      35              40              45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
      50              55              60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
      65              70              75              80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
      85              90              95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
      100             105             110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
      115             120             125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
      130             135             140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
      145             150             155             160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
      165             170             175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
      180             185             190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
      195             200             205

```

```

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
210                215                220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
225                230                235                240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
                245                250                255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
                260                265                270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
275                280                285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
290                295                300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
305                310                315                320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
                325                330                335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
340                345                350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
355                360                365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
370                375                380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
385                390                395                400

```


Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

580

585

<210> 179
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 179

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 Ser Tyr
20 25 30

Ala 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 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105

<210> 180
<211> 257
<212> PRT
<213> Штучна

<220>

~~<223> Мутантна послідовність Lama glama~~

<400> 180

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Ala Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Ser Ile Val Pro Arg Ser Lys Leu Glu Pro Tyr Glu Tyr Asp
100 105 110

Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
130 135 140

Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
145 150 155 160

Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Ala Gly Lys
165 170 175

Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys Ile Arg Cys Ser Asp Gly Ser Thr Tyr
180 185 190

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala
195 200 205

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
210 215 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Val Pro Arg Ser Lys Leu Glu
225 230 235 240

Pro Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
245 250 255

Ser

<210> 181

<211> 288

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 181

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Ala Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Ser Ile Val Pro Arg Ser Lys Leu Glu Pro Tyr Glu Tyr Asp
100 105 110

Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
145 150 155 160

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
165 170 175

Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
180 185 190

Phe Asp Asp Tyr Ala Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Ala Gly Lys Glu
195 200 205

Arg Glu Gly Val Ser Cys Ile Arg Cys Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr
210 215 220

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Lys
225 230 235 240

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
245 250 255

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Val Pro Arg Ser Lys Leu Glu Pro
260 265 270

Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
275 280 285

<210> 182
<211> 255
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 182

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Val Gly Asp
1 5 10 15

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

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

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

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

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

~~Ala Gly Ser Tyr Asp Gly Asn Tyr Tyr Ile Pro Gly Phe Tyr Lys Asp~~
~~100 105 110~~

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
130 135 140

Gln Val Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr
145 150 155 160

Phe Ser Thr Tyr Leu Met Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
165 170 175

Glu Arg Glu Phe Ala Ala Gly Ile Trp Ser Ser Gly Asp Thr Ala Tyr
180 185 190

Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
195 200 205

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala
210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Ser Tyr Asp Gly Asn Tyr Tyr Ile Pro Gly
225 230 235 240

Phe Tyr Lys Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250 255

<210> 183
<211> 267
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 183

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Leu	Asp	Asp	Tyr	20	25	30	
Ala	Ile	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Gly	Val	35	40	45	
Ser	Ser	Ile	Arg	Asp	Asn	Asp	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Asp	Asn	Asp	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Ala	Val	Pro	Ala	Gly	Arg	Leu	Arg	Phe	Gly	Glu	Gln	Trp	Tyr	Pro	100	105	110	
Leu	Tyr	Glu	Tyr	Asp	Ala	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	115	120	125	
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	130	135	140	
Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	145	150	155	160
Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Leu	Asp	Asp	Tyr	Ala	Ile	Gly	Trp	Phe	Arg	165	170	175	
Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Gly	Val	Ser	Ser	Ile	Arg	Asp	Asn	180	185	190	

Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
195 200 205

Ser Ser Asp Asn Asp Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
210 215 220

Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Val Pro Ala Gly
225 230 235 240

Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp Tyr Pro Leu Tyr Glu Tyr Asp Ala
245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
260 265

<210> 184

<211> 298

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 184

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp Tyr Pro
100 105 110

Leu Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
145 150 155 160

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
165 170 175

Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
180 185 190

Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln
195 200 205

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Ser Ile Arg Asp Asn Asp
210 215 220

Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
225 230 235 240

Ser Asp Asn Asp Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
245 250 255

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg
260 265 270

Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp Tyr Pro Leu Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp
275 280 285

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
290 295

<210> 185
<211> 267
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 185

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Leu Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Tyr Gly Glu Gln Trp Tyr Pro
100 105 110

Ile Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
145 150 155 160

Ala Ala Ser Gly Ile Thr Leu Asp Asp Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg
165 170 175

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Ser Ile Arg Asp Asn
180 185 190

Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
195 200 205

Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
210 215 220

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Val Pro Ala Gly
225 230 235 240

Arg Leu Arg Tyr Gly Glu Gln Trp Tyr Pro Ile Tyr Glu Tyr Asp Ala
245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
260 265

<210> 186

<211> 387

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 186

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
180 185 190

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
195 200 205

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala
260 265 270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp
275 280 285

Asp Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
290 295 300

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Asp Lys Asn Thr
325 330 335

~~Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr~~
~~340 345 350~~

Tyr Cys Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp
355 360 365

Tyr Pro Leu Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
370 375 380

Val Ser Ser
385

<210> 187
<211> 387
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 187

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp Tyr Pro
100 105 110

Leu Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys
145 150 155 160

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg
165 170 175

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser
180 185 190

Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
195 200 205

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
210 215 220

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu
225 230 235 240

Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
275 280 285

Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
290 295 300

Lys Glu Arg Glu Phe Val Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr
305 310 315 320

Asp Ala Val Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
325 330 335

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
340 345 350

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu
355 360 365

Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
370 375 380

Val Ser Ser
385

<210> 188
<211> 387
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 188

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

```

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
    35                40                45

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

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

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

Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp Tyr Pro
                100                105                110

Leu Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
                115                120                125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Leu Val Glu
    130                135                140

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
    145                150                155                160

Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Gly Trp Phe Arg
                165                170                175

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Val Ala Ile Ser Lys Gly
                180                185                190

Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser
                195                200                205

Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg
    210                215                220

```

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Arg Ala Tyr Gly
225 230 235 240

Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
245 250 255

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
260 265 270

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
275 280 285

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
290 295 300

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
305 310 315 320

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
325 330 335

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
340 345 350

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
355 360 365

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
370 375 380

Val Ser Ser
385

<210> 189

<211> 375

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 189

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala
115 120 125

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
130 135 140

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
145 150 155 160

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
165 170 175

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
180 185 190

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
195 200 205

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
210 215 220

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
225 230 235 240

Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
245 250 255

Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
260 265 270

Phe Thr Leu Asp Asp Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
275 280 285

Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Ser Ile Arg Asp Asn Asp Gly Ser Thr
290 295 300

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn
305 310 315 320

Asp Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
325 330 335

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Phe
340 345 350

Gly Glu Gln Trp Tyr Pro Leu Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly
355 360 365

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
370 375

<210> 190
<211> 384
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 190

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Ala Leu Asp Tyr Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly
165 170 175

Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ile Thr
180 185 190

Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
195 200 205

Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Asp Ser Gly Gly Tyr Ile Asp Tyr
225 230 235 240

Asp Cys Met Gly Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
245 250 255

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
260 265 270

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg
275 280 285

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser
290 295 300

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile
305 310 315 320

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
325 330 335

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met
340 345 350

Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly
355 360 365

Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
370 375 380

<210> 191

<211> 384

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 191

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
180 185 190

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
195 200 205

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
260 265 270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Leu Asp
275 280 285

Tyr Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu
290 295 300

Gly Val Ser Cys Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ile Thr Tyr Tyr Val Asp
305 310 315 320

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
325 330 335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
340 345 350

Tyr Cys Ala Thr Asp Ser Gly Gly Tyr Ile Asp Tyr Asp Cys Met Gly
355 360 365

Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
370 375 380

<210> 192

<211> 519

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 192

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Ala Leu Asp Tyr Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly
165 170 175

Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ile Thr
180 185 190

Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
195 200 205

Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Asp Ser Gly Gly Tyr Ile Asp Tyr
225 230 235 240

Asp Cys Met Gly Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
245 250 255

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
260 265 270

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg
275 280 285

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser
290 295 300

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile
305 310 315 320

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
325 330 335

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met
340 345 350

Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly
355 360 365

Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser

385 390 395 400

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
405 410 415

Ala Ser Gly Phe Ala Leu Asp Tyr Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln
420 425 430

Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys Ile Ser Ser Ser Asp
435 440 445

Gly Ile Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
450 455 460

Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
465 470 475 480

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Asp Ser Gly Gly Tyr
485 490 495

Ile Asp Tyr Asp Cys Met Gly Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
500 505 510

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
515

<210> 193
<211> 525
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 193

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
  20                               25                               30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
  50                               55                               60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
 100                               105                               110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 115                               120                               125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 130                               135                               140

Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 145                               150                               155                               160

Phe Thr Leu Asp Asp Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
 165                               170                               175

Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Ser Ile Arg Asp Asn Asp Gly Ser Thr
 180                               185                               190

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn

```

195	200	205
Asp Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp		
210	215	220
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Phe		
225	230	235 240
Gly Glu Gln Trp Tyr Pro Leu Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly		
	245	250 255
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser		
	260	265 270
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly		
	275	280 285
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr		
	290	295 300
Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val		
	305	310 315 320
Ser Ser Ile Arg Asp Asn Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
	325	330 335
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Asp Lys Asn Thr Val Tyr		
	340	345 350
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	355	360 365
Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp Tyr Pro		
	370	375 380

Leu Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
385 390 395 400

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
405 410 415

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys
420 425 430

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg
435 440 445

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser
450 455 460

Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
465 470 475 480

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
485 490 495

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu
500 505 510

Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
515 520 525

<210> 194
<211> 525
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 194

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr	20	25	30
Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val	35	40	45
Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu	50	55	60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu	65	70	75
Gln Ile Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	85	90	95
Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr	100	105	110
Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly	115	120	125
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly	130	135	140
Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly	145	150	155
Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly	165	170	175
Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr	180	185	190

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
195 200 205

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala
260 265 270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp
275 280 285

Asp Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
290 295 300

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Asp Lys Asn Thr
325 330 335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
340 345 350

Tyr Cys Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp
355 360 365

Tyr Pro Leu Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
370 375 380

Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
385 390 395 400

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu
405 410 415

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr Ala Ile Gly Trp
420 425 430

Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Ser Ile Arg
435 440 445

Asp Asn Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
450 455 460

Thr Ile Ser Ser Asp Asn Asp Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
465 470 475 480

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Val Pro
485 490 495

Ala Gly Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp Tyr Pro Leu Tyr Glu Tyr
500 505 510

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
515 520 525

<210> 195

<211> 525

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 195

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Thr Leu Asp Asp Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Ser Ile Arg Asp Asn Asp Gly Ser Thr
180 185 190

```

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn
      195              200              205

Asp Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
      210              215              220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Phe
      225              230              235              240

Gly Glu Gln Trp Tyr Pro Leu Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly
              245              250              255

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
      260              265              270

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
      275              280              285

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
      290              295              300

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      305              310              315              320

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
              325              330              335

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
              340              345              350

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      355              360              365

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
      370              375              380

```

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
385 390 395 400

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu
405 410 415

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr Ala Ile Gly Trp
420 425 430

Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Ser Ile Arg
435 440 445

Asp Asn Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
450 455 460

Thr Ile Ser Ser Asp Asn Asp Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
465 470 475 480

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Val Pro
485 490 495

Ala Gly Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp Tyr Pro Leu Tyr Glu Tyr
500 505 510

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
515 520 525

<210> 196

<211> 515

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 196

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Ala Gly
165 170 175

Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys Ile Arg Cys Ser Asp Gly Ser Thr
180 185 190

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn
195 200 205

Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Val Pro Arg Ser Lys Leu
225 230 235 240

Glu Pro Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
245 250 255

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
260 265 270

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
275 280 285

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Leu Gly Trp Phe
290 295 300

Arg Gln Ala Ala Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys Ile Arg Cys
305 310 315 320

Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
325 330 335

Ile Ser Ser Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser
340 345 350

Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Val
355 360 365

Pro Arg Ser Lys Leu Glu Pro Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly

370

375

380

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
385 390 395 400

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
405 410 415

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
420 425 430

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
435 440 445

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
450 455 460

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
465 470 475 480

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
485 490 495

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
500 505 510

Val Ser Ser
515

<210> 197

<211> 515

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 197

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr

```

180
185
190
Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
195                200                205

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
210                215                220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
225                230                235                240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245                250                255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala
260                265                270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp
275                280                285

Asp Tyr Ala Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Ala Gly Lys Glu Arg Glu
290                295                300

Gly Val Ser Cys Ile Arg Cys Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
305                310                315                320

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Lys Asn Thr
325                330                335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
340                345                350

Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Val Pro Arg Ser Lys Leu Glu Pro Tyr Glu
355                360                365

```

Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
385 390 395 400

Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
405 410 415

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Ala
420 425 430

Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys Ile Arg Cys Ser Asp Gly Ser
435 440 445

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp
450 455 460

Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
465 470 475 480

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Val Pro Arg Ser Lys
485 490 495

Leu Glu Pro Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
500 505 510

Val Ser Ser
515

<210> 198

<211> 515

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 198

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Ala Gly
165 170 175

Lys	Glu	Arg	Glu	Gly	Val	Ser	Cys	Ile	Arg	Cys	Ser	Asp	Gly	Ser	Thr	180	185	190	
Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Asp	Asn	195	200	205	
Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	210	215	220	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ile	Val	Pro	Arg	Ser	Lys	Leu	225	230	235	240
Glu	Pro	Tyr	Glu	Tyr	Asp	Ala	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	245	250	255	
Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	260	265	270	
Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Asn	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	275	280	285	
Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe	Gly	Met	Ser	Trp	Val	290	295	300	
Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	305	310	315	320
Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	325	330	335	
Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Thr	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	340	345	350	
Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	355	360	365	

Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
385 390 395 400

Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
405 410 415

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Ala
420 425 430

Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys Ile Arg Cys Ser Asp Gly Ser
435 440 445

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp
450 455 460

Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
465 470 475 480

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Val Pro Arg Ser Lys
485 490 495

Leu Glu Pro Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
500 505 510

Val Ser Ser
515

<210> 199

<211> 382

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 199

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
180 185 190

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
195 200 205

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala
260 265 270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp
275 280 285

Asp Tyr Ala Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Ala Gly Lys Glu Arg Glu
290 295 300

Gly Val Ser Cys Ile Arg Cys Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
305 310 315 320

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Lys Asn Thr
325 330 335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
340 345 350

Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Val Pro Arg Ser Lys Leu Glu Pro Tyr Glu
355 360 365

Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
370 375 380

<210> 200
<211> 387
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 200

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
180 185 190

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
195 200 205

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
260 265 270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Leu Asp
275 280 285

Asp Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
290 295 300

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr
325 330 335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
340 345 350

Tyr Cys Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Tyr Gly Glu Gln Trp
355 360 365

Tyr Pro Ile Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
370 375 380

Val Ser Ser
385

<210> 201
<211> 387
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 201

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
180 185 190

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
195 200 205

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
260 265 270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Thr Leu Asp
275 280 285

Asp Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
290 295 300

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr
325 330 335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
340 345 350

Tyr Cys Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Tyr Gly Glu Gln Trp
355 360 365

Tyr Pro Ile Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
370 375 380

Val Ser Ser
385

<210> 202
<211> 387
<212> PRT
<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 202

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
180 185 190

```

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 195                      200                      205

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
 210                      215                      220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
 225                      230                      235                      240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245                      250                      255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 260                      265                      270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Leu Asp
 275                      280                      285

Asp Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
 290                      295                      300

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 325                      330                      335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 340                      345                      350

Tyr Cys Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Tyr Gly Glu Gln Trp
 355                      360                      365
-----

Tyr Pro Ile Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

```


370

375

380

Val Ser Ser
385

<210> 203
<211> 387
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 203

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

```

      Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
      130                      135                      140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145                      150                      155                      160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
                      165                      170                      175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
                      180                      185                      190

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
195                      200                      205

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
210                      215                      220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
225                      230                      235                      240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245                      250                      255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
260                      265                      270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Leu Asp
275                      280                      285

Asp Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
290                      295                      300
-----

Gly Val Ser Ala Ile Arg Glu Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp

```

```

305                               310                               315                               320
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr
325                               330                               335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
340                               345                               350

Tyr Cys Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Tyr Gly Glu Gln Trp
355                               360                               365

Tyr Pro Ile Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
370                               375                               380

Val Ser Ser
385

<210> 204
<211> 387
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 204

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20                               25                               30

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

-----

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50                               55                               60

```

Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	65	70	75	80
Gln	Ile	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	85	90	95	
Ser	Ser	Arg	Ala	Tyr	Gly	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Leu	Ala	Asp	Thr	Tyr	100	105	110	
Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	115	120	125	
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	130	135	140	
Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Asn	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	145	150	155	160
Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	165	170	175	
Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	180	185	190	
Leu	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	195	200	205	
Ala	Lys	Thr	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	210	215	220	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser	225	230	235	240

Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly				

```

                245                250                255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
      260                265                270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Leu Asp
      275                280                285

Asp Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
      290                295                300

Gly Val Ser Ala Ile Arg Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
      305                310                315                320

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr
      325                330                335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
      340                345                350

Tyr Cys Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Tyr Gly Glu Gln Trp
      355                360                365

Tyr Pro Ile Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
      370                375                380

Val Ser Ser
      385

<210> 205
<211> 387
<212> PRT
<213> Штучна

-----
<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

```

<400> 205

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr

	180		185		190
Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn					
195		200		205	
Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp					
210		215		220	
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser					
225		230		235	240
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly					
	245		250		255
Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro					
	260		265		270
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Thr Leu Asp					
	275		280		285
Asp Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu					
	290		295		300
Gly Val Ser Ala Ile Arg Asp Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp					
305		310		315	320
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr					
	325		330		335
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr					
	340		345		350
Tyr Cys Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Tyr Gly Glu Gln Trp					
	355		360		365

Tyr Pro Ile Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
370 375 380

Val Ser Ser
385

<210> 206

<211> 387

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 206

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly


```

      115              120              125
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 130              135              140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 145              150              155              160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
      165              170              175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
      180              185              190

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 195              200              205

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
 210              215              220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
 225              230              235              240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
      245              250              255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
      260              265              270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Thr Leu Asp
      275              280              285

Asp Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
 290              295              300

```

Gly Val Ser Ala Ile Arg Glu Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
305 310 315 320

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr
325 330 335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
340 345 350

Tyr Cys Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Tyr Gly Glu Gln Trp
355 360 365

Tyr Pro Ile Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
370 375 380

Val Ser Ser
385

<210> 207
<211> 387
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 207

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu

50		55		60											
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu
65					70					75					80
Gln	Ile	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
			85						90					95	
Ser	Ser	Arg	Ala	Tyr	Gly	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Leu	Ala	Asp	Thr	Tyr
			100					105						110	
Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly
		115					120						125		
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly
	130						135						140		
Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Asn	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly
145						150					155				160
Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
						165				170					175
Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr
			180						185					190	
Leu	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn
		195						200						205	
Ala	Lys	Thr	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp
	210							215						220	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser
225							230				235				240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
260 265 270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Thr Leu Asp
275 280 285

Asp Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
290 295 300

Gly Val Ser Ala Ile Arg Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
305 310 315 320

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr
325 330 335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
340 345 350

Tyr Cys Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Tyr Gly Glu Gln Trp
355 360 365

Tyr Pro Ile Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
370 375 380

Val Ser Ser
385

<210> 208

<211> 525

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 208

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
180 185 190

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
195 200 205

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
260 265 270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp
275 280 285

Asp Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
290 295 300

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr
325 330 335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
340 345 350

Tyr Cys Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp
355 360 365

```

Tyr Pro Leu Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
  370                      375                      380

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
  385                      390                      395                      400

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
      405                      410                      415

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr Ala Ile Gly Trp
      420                      425                      430

Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Ala Ile Arg
      435                      440                      445

Asp Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
      450                      455                      460

Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
  465                      470                      475                      480

Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Val Pro
      485                      490                      495

Ala Gly Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp Tyr Pro Leu Tyr Glu Tyr
      500                      505                      510

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      515                      520                      525

```

<210> 209

<211> 525

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 209

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Thr Leu Asp Asp Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Ala Ile Arg Asp Asn Gly Gly Ser Thr
180 185 190

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn
195 200 205

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Phe
225 230 235 240

Gly Glu Gln Trp Tyr Pro Leu Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly
245 250 255

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
260 265 270

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
275 280 285

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr
290 295 300

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
305 310 315 320

Ser Ala Ile Arg Asp Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
325 330 335

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
340 345 350

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
355 360 365

Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp Tyr Pro
370 375 380

Leu Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
385 390 395 400

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
405 410 415

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys
420 425 430

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg
435 440 445

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser
450 455 460

Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
465 470 475 480

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
485 490 495

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu
500 505 510

Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
515 520 525

<210> 210

<211> 515

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 210

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

```

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
      180                      185                      190

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
      195                      200                      205

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
      210                      215                      220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
      225                      230                      235                      240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
      245                      250                      255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
      260                      265                      270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp
      275                      280                      285

Asp Tyr Ala Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
      290                      295                      300

Gly Val Ser Cys Ile Arg Cys Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
      305                      310                      315                      320

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr
      325                      330                      335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
      340                      345                      350
-----
. Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Val Pro Arg Ser Lys Leu Glu Pro Tyr Glu

```

```

355              360              365
Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
370              375              380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
385              390              395              400

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
405              410              415

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro
420              425              430

Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys Ile Arg Cys Ser Gly Gly Ser
435              440              445

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp
450              455              460

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
465              470              475              480

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Val Pro Arg Ser Lys
485              490              495

Leu Glu Pro Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
500              505              510

Val Ser Ser
515

```

```

<210> 211
<211> 515
<212> PRT
<213> Штучна

```

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 211

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly

```

      165              170              175
Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys Ile Arg Cys Ser Gly Gly Ser Thr
      180              185              190

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn
      195              200              205

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
      210              215              220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Val Pro Arg Ser Lys Leu
      225              230              235              240

Glu Pro Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
      245              250              255

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
      260              265              270

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
      275              280              285

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Leu Gly Trp Phe
      290              295              300

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys Ile Arg Cys
      305              310              315              320

Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
      325              330              335

Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser
      340              345              350

```

Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ile Val
355 360 365

Pro Arg Ser Lys Leu Glu Pro Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly
370 375 380

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
385 390 395 400

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
405 410 415

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
420 425 430

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
435 440 445

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
450 455 460

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
465 470 475 480

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
485 490 495

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
500 505 510

Val Ser Ser
515

<210> 212

<211> 384

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 212

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
145 150 155 160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
165 170 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
180 185 190

Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
195 200 205

Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
210 215 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
225 230 235 240

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
260 265 270

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Leu Asp
275 280 285

Tyr Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
290 295 300

Gly Val Ser Cys Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp
305 310 315 320

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
325 330 335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
340 345 350

Tyr Cys Ala Thr Asp Ser Gly Gly Tyr Ile Asp Tyr Asp Cys Ser Gly
355 360 365

Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
370 375 380

<210> 213

<211> 525

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 213

Asp 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 Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Ile Ser Lys Gly Gly Tyr Lys Tyr Asp Ala Val Ser Leu Glu
50 55 60

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

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

Ser Ser Arg Ala Tyr Gly Ser Ser Arg Leu Arg Leu Ala Asp Thr Tyr
100 105 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly			
115	120	125	
.			
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly			
130	135	140	
.			
Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly			
145	150	155	160
.			
Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly			
	165	170	175
.			
Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr			
	180	185	190
.			
Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn			
195	200	205	
.			
Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp			
210	215	220	
.			
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser			
225	230	235	240
.			
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
	245	250	255
.			
Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro			
	260	265	270
.			
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp			
275	280	285	
.			
Asp Tyr Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu			
290	295	300	

```

Gly Val Ser Ala Ile Arg Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
305                      310                      315                      320

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr
                      325                      330                      335

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                      340                      345                      350

Tyr Cys Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp
                      355                      360                      365

Tyr Pro Leu Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
                      370                      375                      380

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
385                      390                      395                      400

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
                      405                      410                      415

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Tyr Ala Ile Gly Trp
                      420                      425                      430

Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Ala Ile Arg
                      435                      440                      445

Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
                      450                      455                      460

Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
465                      470                      475                      480

Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Val Pro
                      485                      490                      495

```

Ala Gly Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp Tyr Pro Leu Tyr Glu Tyr
500 505 510

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
515 520 525

<210> 214
<211> 124
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 214

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Ala Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Ser Ile Val Pro Arg Ser Lys Leu Glu Pro Tyr Glu Tyr Asp
100 105 110

Ala Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 215
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 215

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 Ala Leu Asp Tyr Tyr
 20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 35 40 45

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

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

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

Ala Thr Asp Ser Gly Gly Tyr Ile Asp Tyr Asp Cys Met Gly Leu Gly
 100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 216
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 216

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1           5           10           15

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

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35           40           45

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

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

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

Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp Tyr Pro
100          105          110

Leu Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115          120          125

Ser

```

<210> 217

<211> 129

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 217

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 Leu Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp Tyr Pro
100 105 110

Leu Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 218

<211> 124

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 218

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 Asp Asp Tyr
      20             25             30

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

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

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

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

Ala Ala Ser Ile Val Pro Arg Ser Lys Leu Glu Pro Tyr Glu Tyr Asp
      100            105            110

Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115            120

```

<210> 219

<211> 126

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 219

```

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 Ala Leu Asp Tyr Tyr
      20             25             30

```

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

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

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

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

Ala Thr Asp Ser Gly Gly Tyr Ile Asp Tyr Asp Cys Met Gly Leu Gly
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 220

<211> 124

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 220

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 Asp Asp Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Ala Ser Ile Val Pro Arg Ser Lys Leu Glu Pro Tyr Glu Tyr Asp
100 105 110

Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 221

<211> 126

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 221

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 Ala Leu Asp Tyr Tyr
20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

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

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

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

Ala Thr Asp Ser Gly Gly Tyr Ile Asp Tyr Asp Cys Ser Gly Leu Gly
100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 222

<211> 129

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 222

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

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

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Tyr Gly Glu Gln Trp Tyr Pro
100 105 110

Ile Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 223

<211> 129

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 223

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 Leu Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp Tyr Pro
100 105 110

Leu Tyr Glu Tyr Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 224
<211> 5
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 224

Asp Tyr Ala Leu Gly
1 5

<210> 225
<211> 17
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 225

Cys Ile Arg Cys Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 226
<211> 15
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 226

Ser Ile Val Pro Arg Ser Lys Leu Glu Pro Tyr Glu Tyr Asp Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 227
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Lama glama

 <400> 227

 Tyr Tyr Ala Ile Gly
 1 5

 <210> 228
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Lama glama

 <400> 228

 Cys Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ile Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 229
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Lama glama

 <400> 229

 Asp Ser Gly Gly Tyr Ile Asp Tyr Asp Cys Met Gly Leu Gly Tyr Asp
 1 5 10 15

 Tyr

 <210> 230
 <211> 5
 <212> PRT


```

<213> Lama glama

<400> 230

Asp Tyr Ala Ile Gly
1 5

<210> 231
<211> 17
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 231

Cys Ile Arg Asp Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 232
<211> 20
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 232

Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp Tyr Pro Leu Tyr
1 5 10 15

Glu Tyr Asp Ala
20

<210> 233
<211> 5
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 233

```

```

Asp Tyr Ala Ile Gly
1 5

```

<210> 234
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 234

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

Gly

<210> 235
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 235

Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp Tyr Pro Leu Tyr
 1 5 10 15

Glu Tyr Asp Ala
 20

<210> 236
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 236

Asp Tyr Ala Leu Gly
 1 5

<210> 237
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 237

Cys Ile Arg Cys Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 238

<211> 15

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 238

Ser Ile Val Pro Arg Ser Lys Leu Glu Pro Tyr Glu Tyr Asp Ala
1 5 10 15

<210> 239

<211> 5

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 239

Tyr Tyr Ala Ile Gly
1 5

<210> 240

<211> 17

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 240

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

Gly

<210> 241
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 241

Asp Ser Gly Gly Tyr Ile Asp Tyr Asp Cys Met Gly Leu Gly Tyr Asp
 1 5 10 15

Tyr

<210> 242
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 242

Asp Tyr Ala Leu Gly
 1 5

<210> 243
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 243

Cys Ile Arg Cys Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 244
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 244

Ser Ile Val Pro Arg Ser Lys Leu Glu Pro Tyr Glu Tyr Asp Ala
1 5 10 15

<210> 245

<211> 5

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 245

Tyr Tyr Ala Ile Gly
1 5

<210> 246

<211> 17

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 246

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

Gly

<210> 247

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 247

Asp Ser Gly Gly Tyr Ile Asp Tyr Asp Cys Ser Gly Leu Gly Tyr Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 248
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 248

Asp Tyr Ala Ile Gly
 1 5

<210> 249
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна

<220>
 <223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 249

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

Gly

<210> 250
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Штучна

<220>
 <223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 250

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

Glu Tyr Asp Ala

20

<210> 251
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 251

Asp Tyr Ala Ile Gly
 1 5

<210> 252
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна

<220>
 <223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 252

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

Gly

<210> 253
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Штучна

<220>
 <223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 253

Val Pro Ala Gly Arg Leu Arg Phe Gly Glu Gln Trp Tyr Pro Leu Tyr
 1 5 10 15

Glu Tyr Asp Ala

20

<210> 254

<211> 115

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Мутантна послідовність Lama glama

<400> 254

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

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

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

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

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

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

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 255

<211> 5

<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 255

Ser Phe Gly Met Ser
1 5

<210> 256
<211> 17
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 256

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

Gly

<210> 257
<211> 6
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 257

Gly Gly Ser Leu Ser Arg
1 5

<210> 258
<211> 5
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 258

Leu Asn Leu Met Gly
1 5

<210> 259

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 259

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

<210> 260
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 260

Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu
 1 5

<210> 261
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 261

Ile Asn Leu Leu Gly
 1 5

<210> 262
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 262

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

<210> 263
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Lama glama

<400> 263

Arg Arg Thr Trp His Ser Glu Leu
1 5

<210> 264

<211> 5

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 264

Ser Phe Gly Met Ser
1 5

<210> 265

<211> 17

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 265

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

Gly

<210> 266

<211> 7

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 266

Gly Arg Ser Val Ser Arg Ser
1 5

~~<210> 267~~

~~<211> 5~~

~~<212> PRT~~

<213> Lama glama

<400> 267

Ser Phe Gly Met Ser
1 5

<210> 268

<211> 17

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 268

Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Asp Lys Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 269

<211> 5

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 269

Gly Arg Gly Ser Pro
1 5

<210> 270

<211> 5

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 270

Ser Phe Gly Met Ser
1 5

<210> 271

<211> 17

<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 271

Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ser Asp Lys Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 272
<211> 5
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 272

Gly Arg Gly Ser Pro
1 5

<210> 273
<211> 5
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 273

Asn Tyr Trp Met Tyr
1 5

<210> 274
<211> 17
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 274

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

Gly

```

<210> 275
<211> 13
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 275

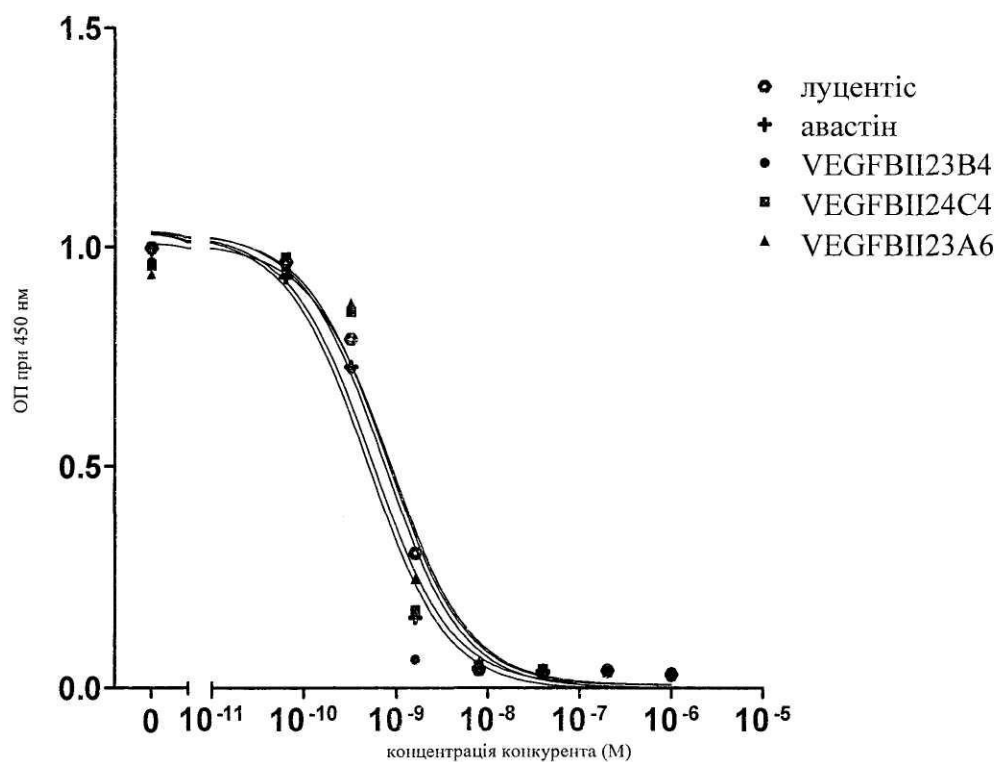
Asp Arg Glu Ala Gln Val Asp Thr Leu Asp Phe Asp Tyr
1             5             10

```

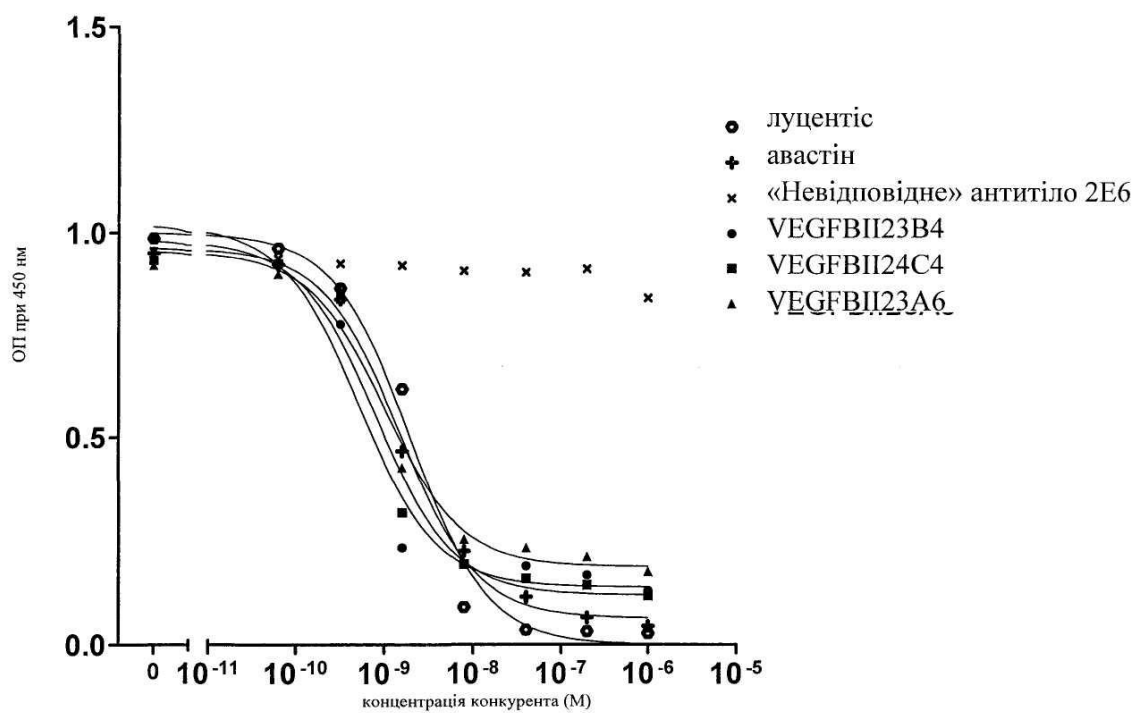
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Біспецифічна зв'язувальна молекула, яка містить: VEGF-зв'язувальний імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, що зв'язує сироватковий альбумін, і Ang2-зв'язувальний імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, причому:
 - зазначений VEGF-зв'язувальний імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен має наступні послідовності CDR:
 - CDR1: SYSMG,
 - CDR2: AISKGGYKYDAVSLEG,
 - CDR3: SRAYGSSRLRLADTYEY,
 - зазначений імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен, що зв'язує сироватковий альбумін, має наступні послідовності CDR:
 - CDR1: SFGMS (SEQ ID NO: 255),
 - CDR2: SISGSGSDTLYADSVKG (SEQ ID NO: 256),
 - CDR3: GGSLSR (SEQ ID NO: 257),
 - зазначений Ang2-зв'язувальний імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен має наступні послідовності CDR:
 - CDR1: DYAI G (SEQ ID NO: 248),
 - CDR2: AIRSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 249),
 - CDR3: VPAGRLRYGEQWYPIYEYDA (SEQ ID NO: 250),
 - і де зазначений Ang2-зв'язувальний імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен зв'язується з Ang2 щонайменше у 5000 разів сильніше, ніж з Ang1 або Ang4.
2. Біспецифічна зв'язувальна молекула за п. 1, у якій зазначені імуноглобулінові одиничні варіабельні домени являють собою VHH.
3. Біспецифічна зв'язувальна молекула, яка має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 207 (VEGFANGBII00022).
4. Молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує біспецифічну зв'язувальну молекулу за будь-яким з пп. 1-3.
5. Вектор, який містить молекулу нуклеїнової кислоти за п. 4.
6. Клітина-хазяїн, що містить вектор за п. 5.
7. Фармацевтична композиція, яка містить як діючу речовину щонайменше одну біспецифічну зв'язувальну молекулу за будь-яким з пп. 1-3.
8. Фармацевтична композиція за п. 7, призначена для лікування раку або для лікування очних хвороб.
9. Спосіб одержання біспецифічної зв'язувальної молекули за будь-яким з пп. 1-3, який включає стадії, на яких: культивують клітини-хазяїни за п. 6 в умовах, які забезпечують експресію зазначеної біспецифічної зв'язувальної молекули; та вивільняють або виділяють з культури зазначену біспецифічну зв'язувальну молекулу, яка експресується зазначеними клітинами-хазяїнами.
10. Спосіб за п. 9, який додатково включає стадію, на якій: додатково очищають або модифікують, або включають у препаративну форму зазначену біспецифічну зв'язувальну молекулу.

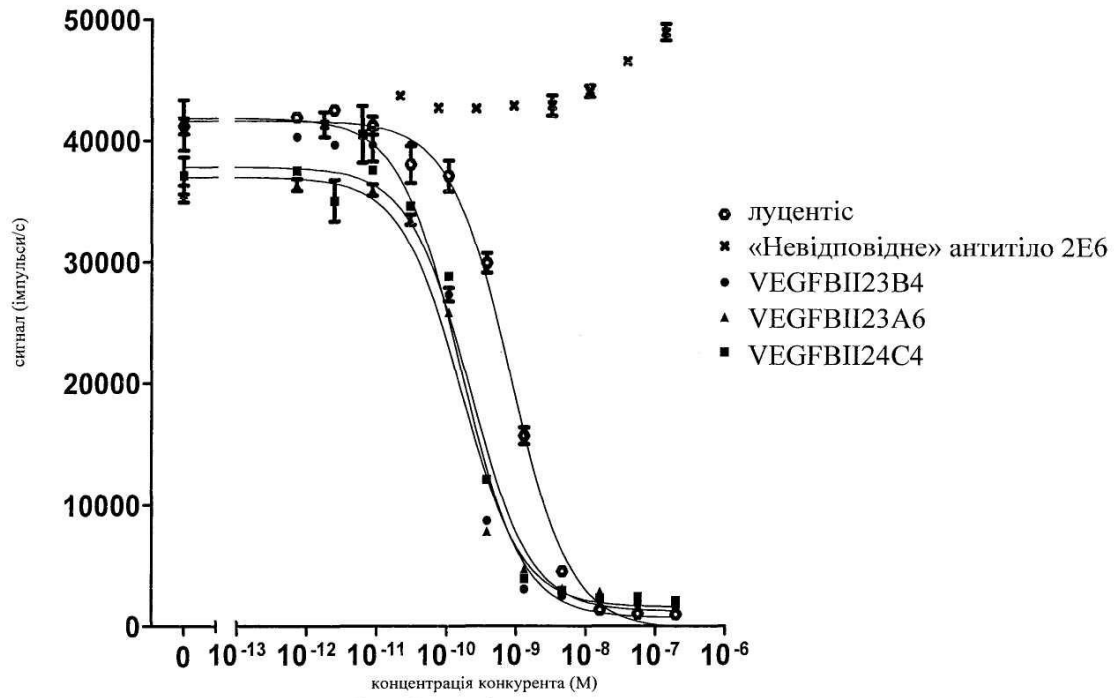
Фіг. 1



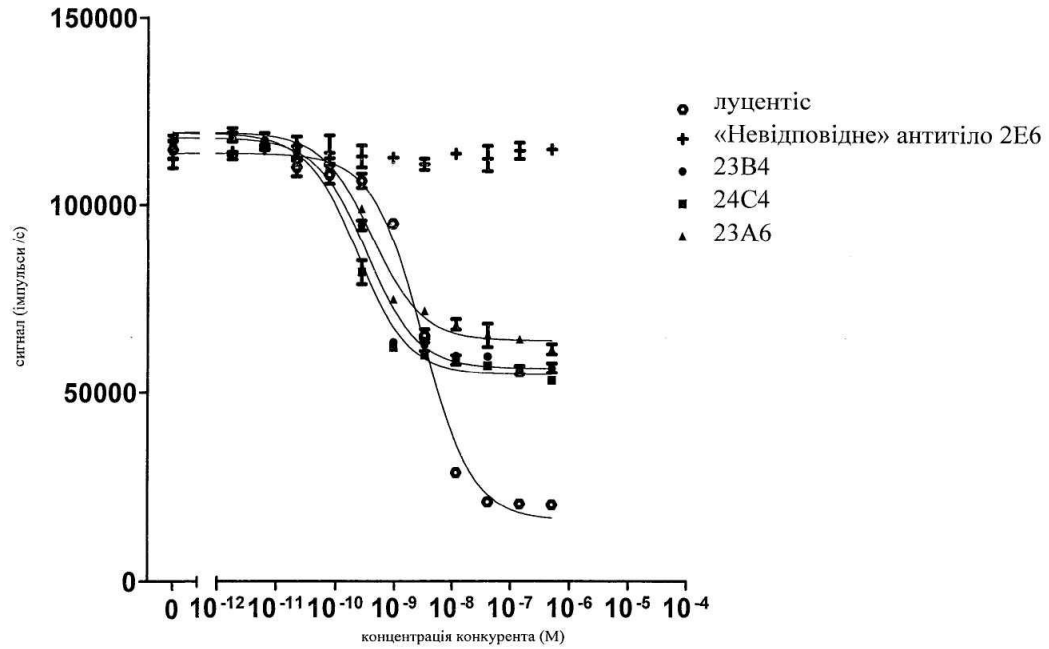
Фіг. 2



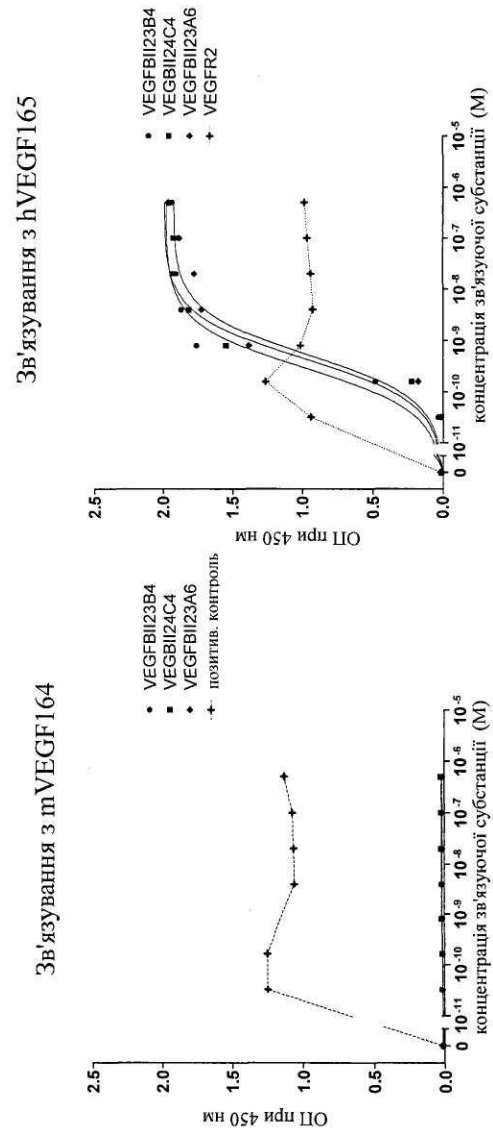
Фіг. 3



Фіг. 4

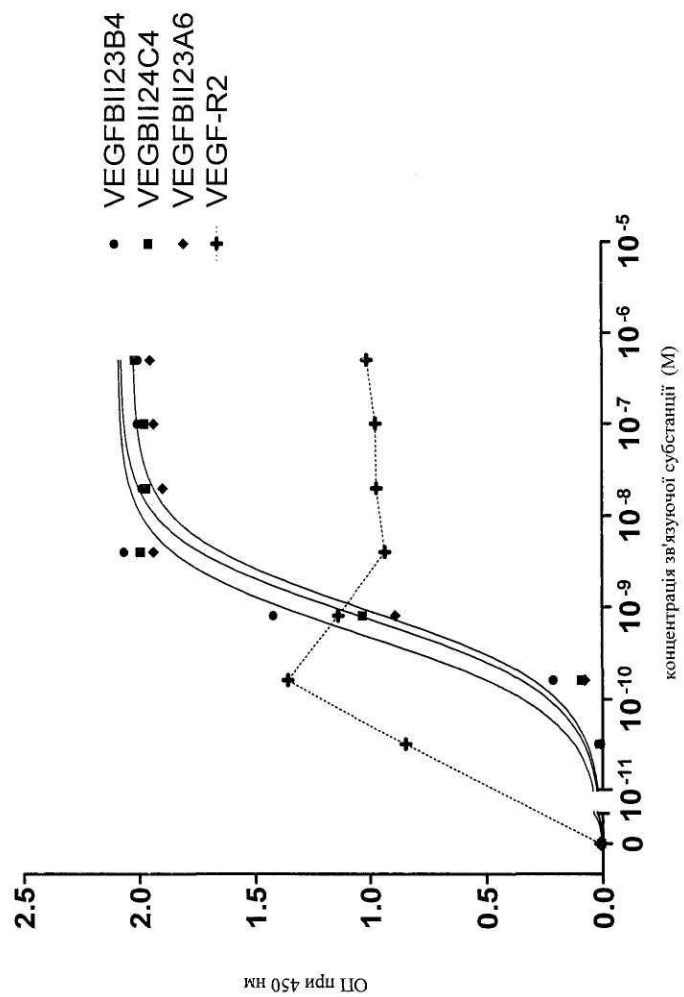


Фіг. 5

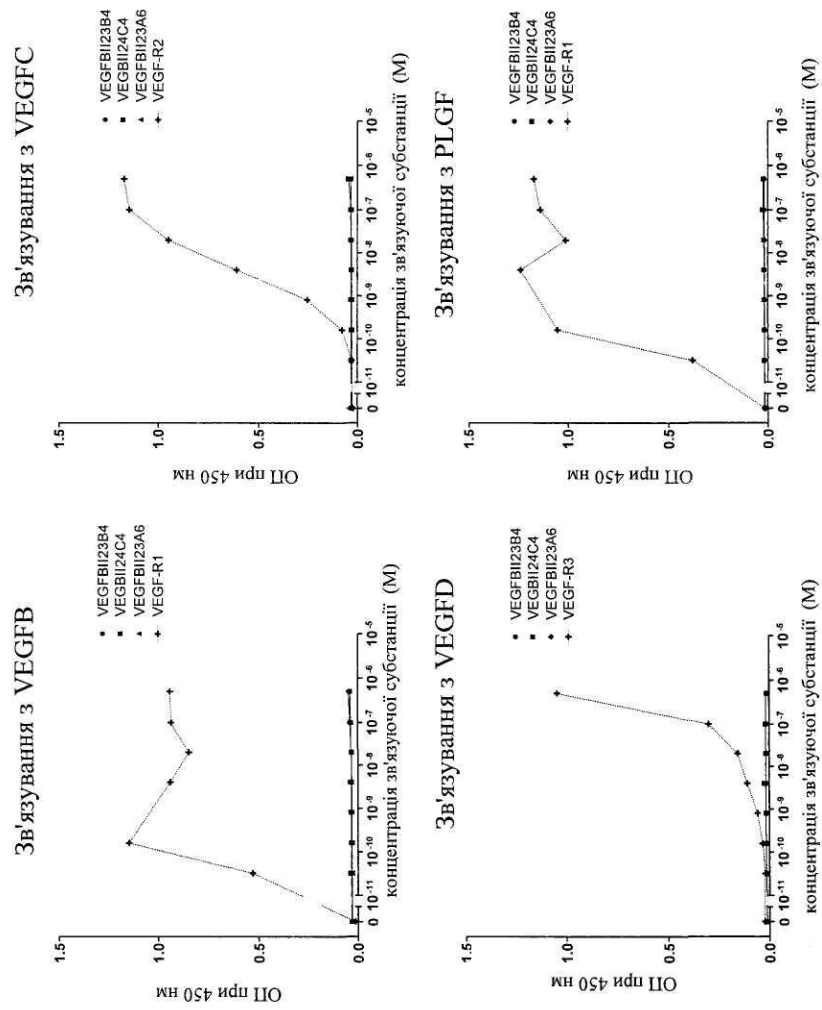


Фіг. 6

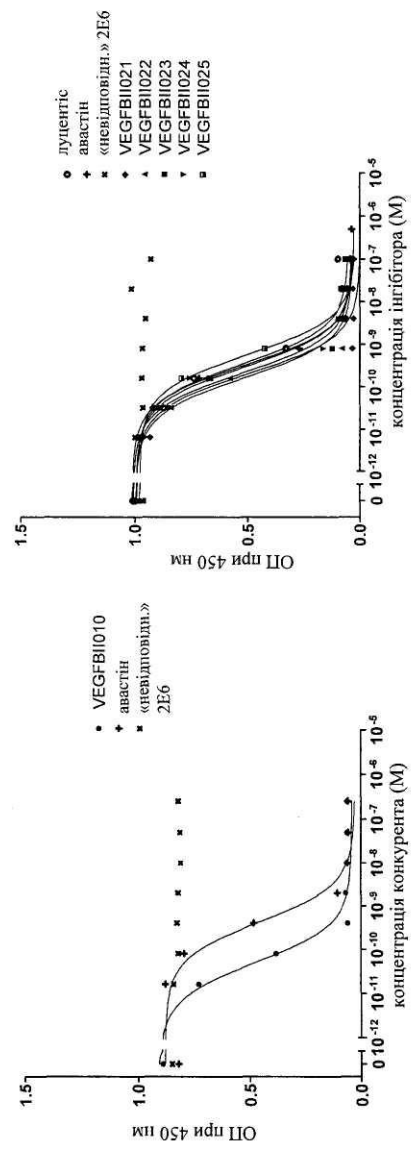
Зв'язування з hVEGF121



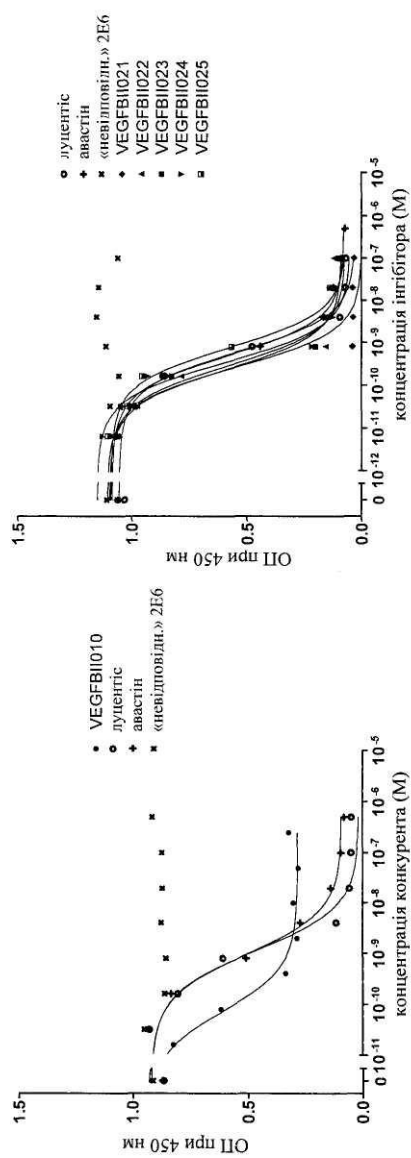
Фиг. 7



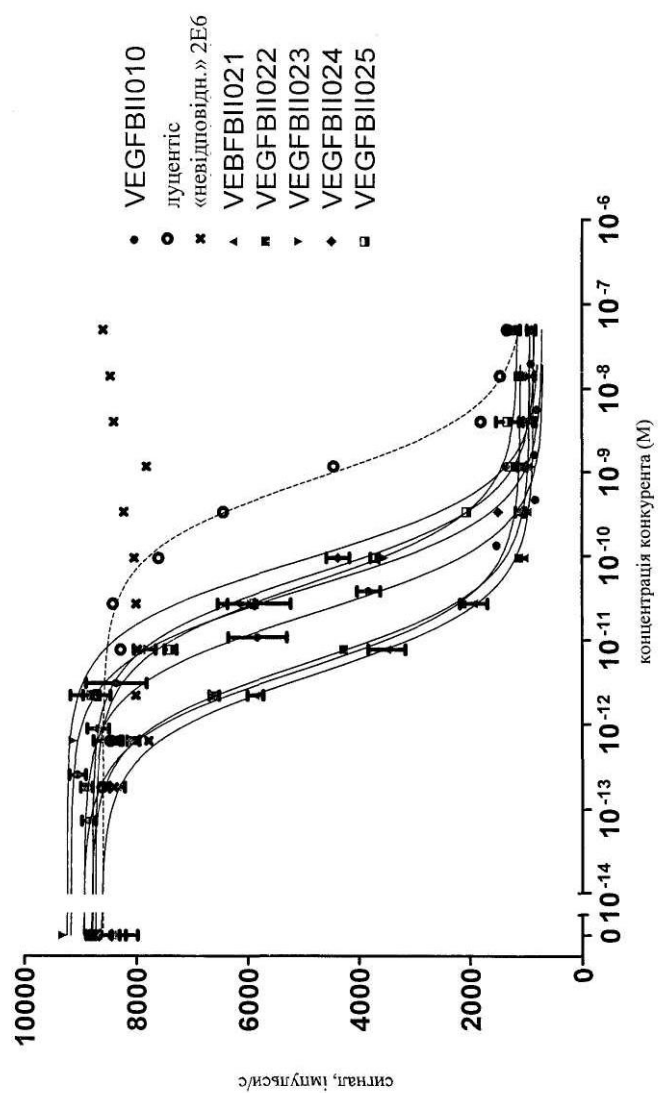
Фиг. 8



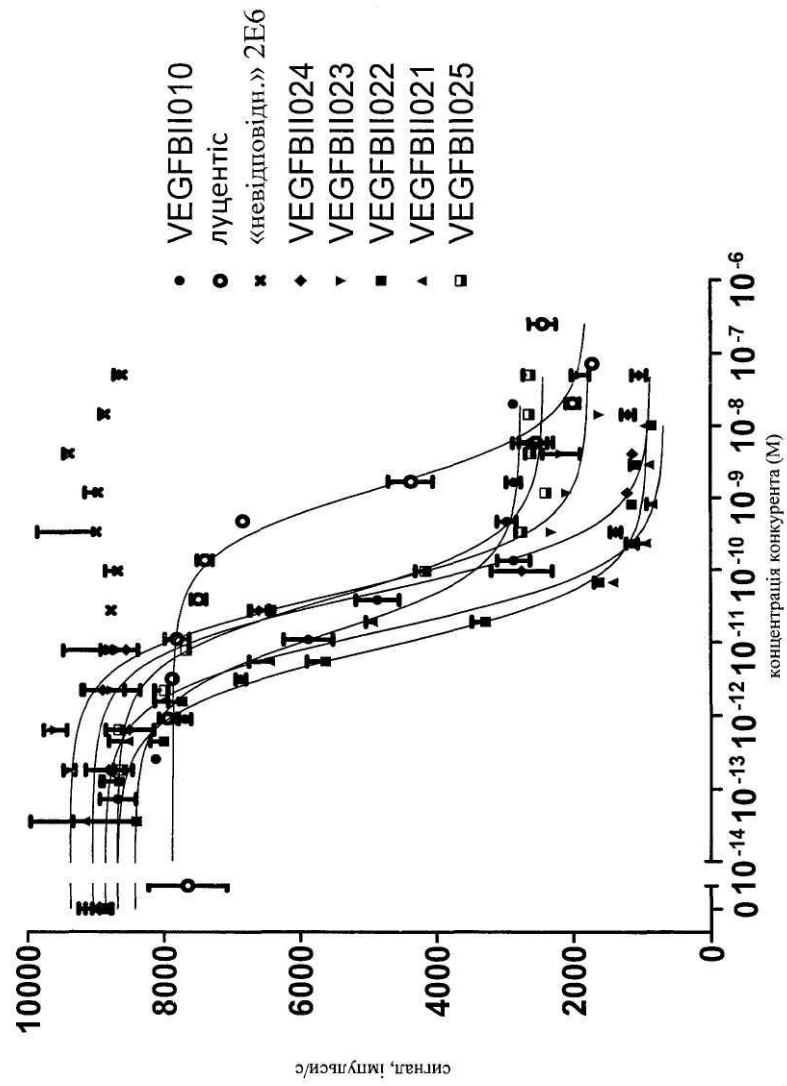
Фиг. 9



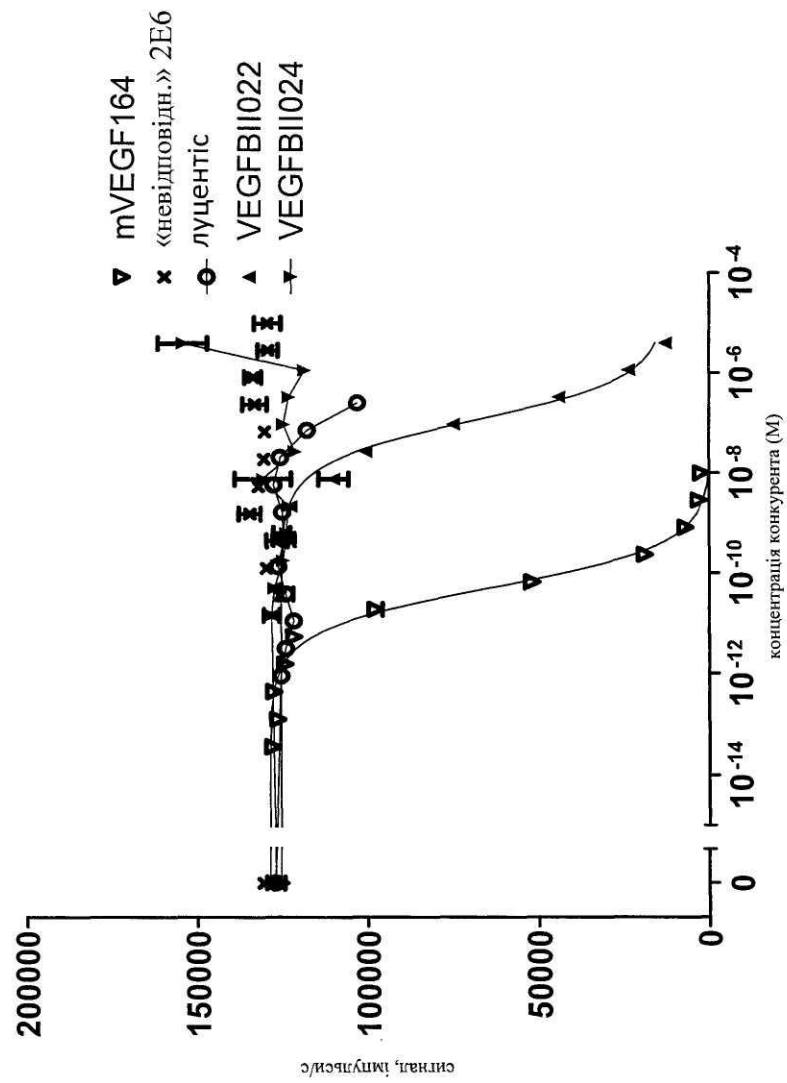
Фіг. 10



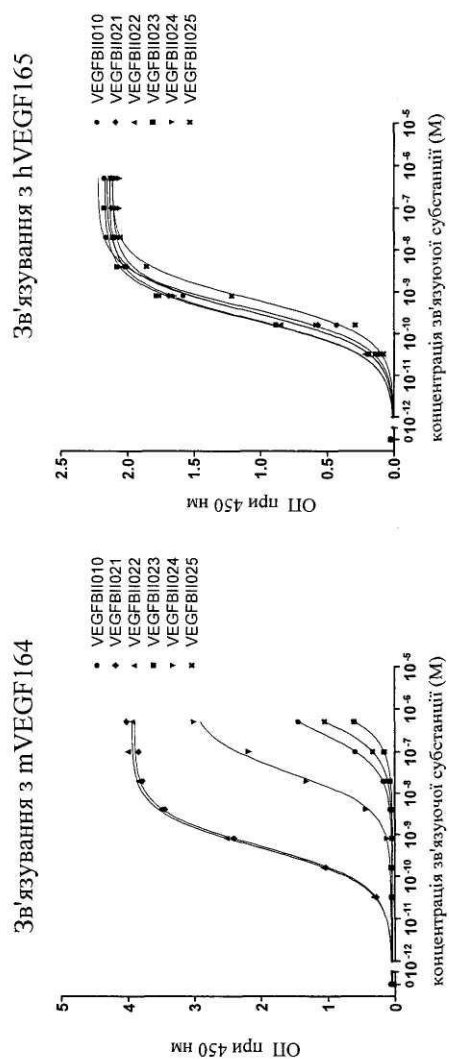
Фиг. 11



Фиг. 12

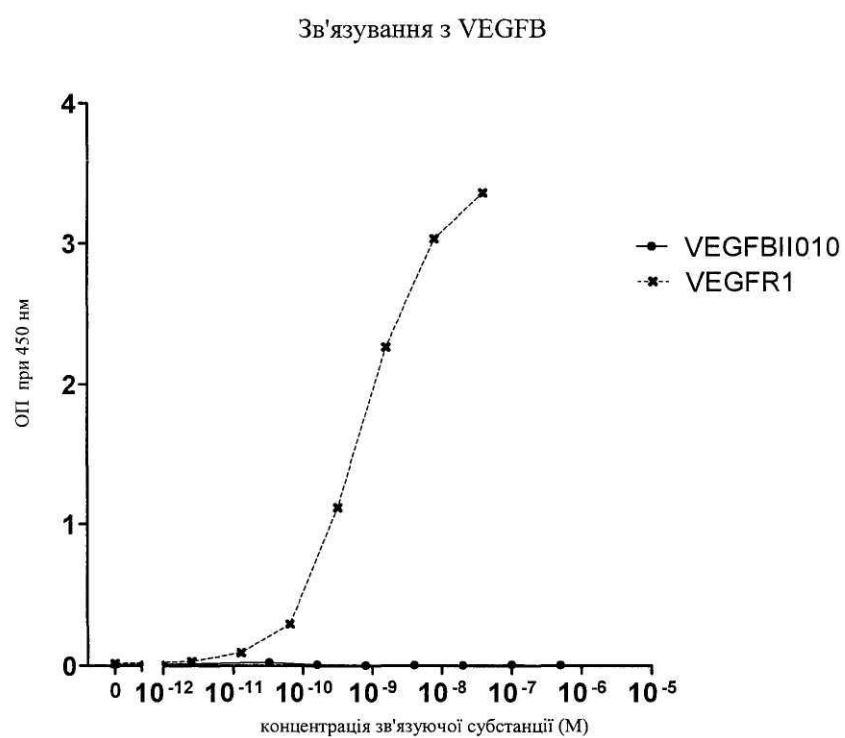


Фиг. 13



Фіг. 14-1

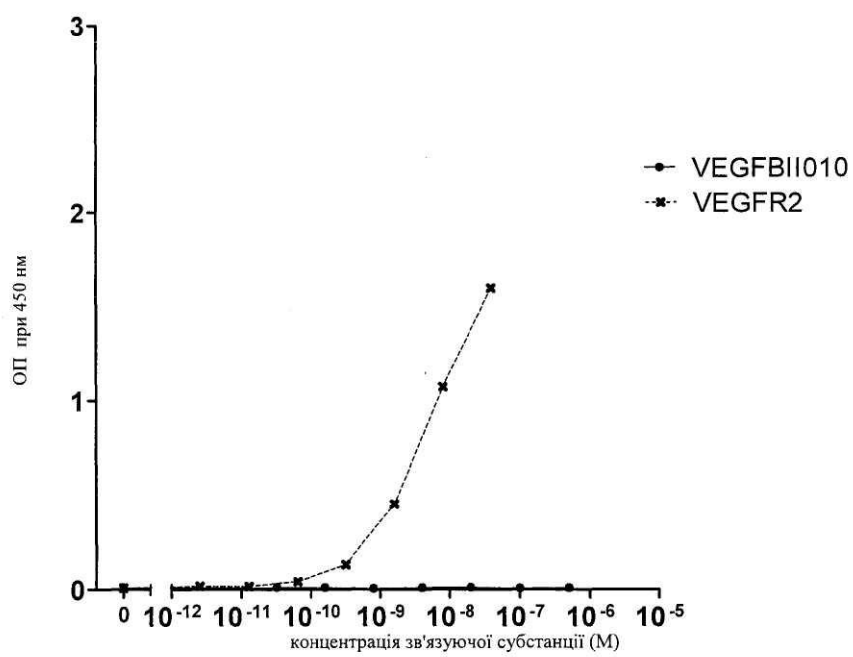
A



Фіг. 14-2

Б

Зв'язування з VEGFC



Фіг. 14-3

B

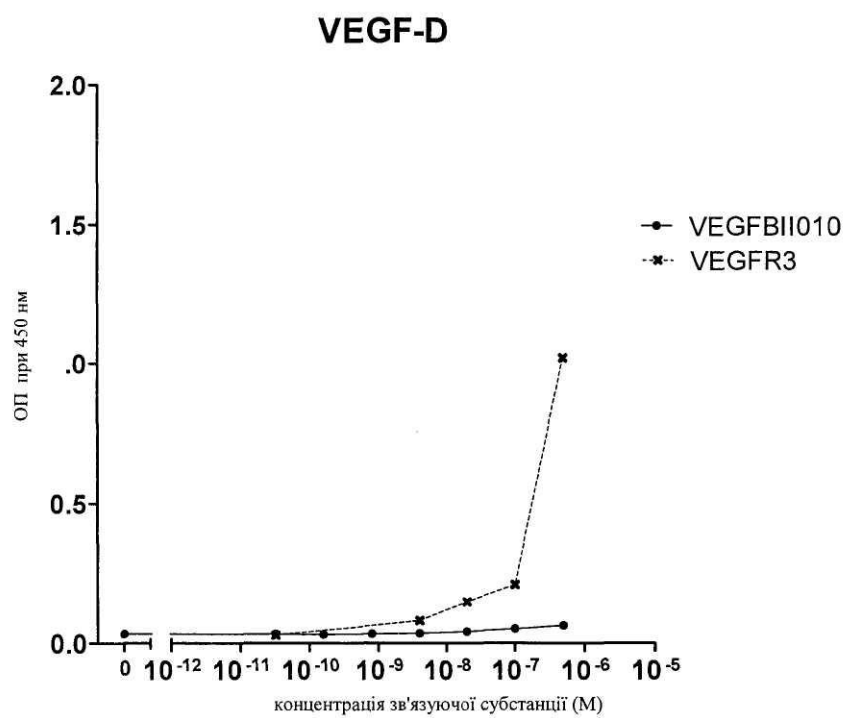
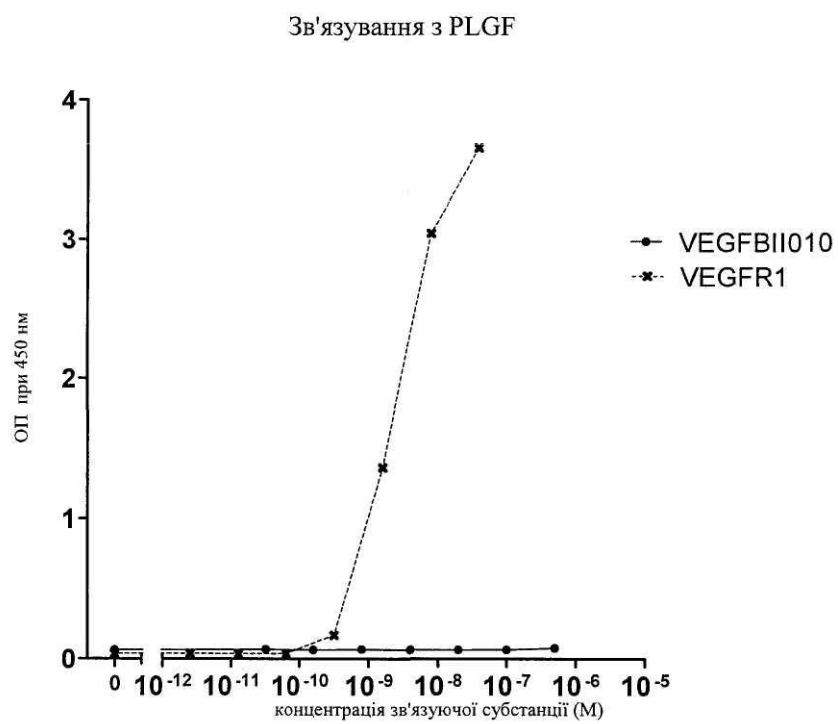


Fig. 14-4

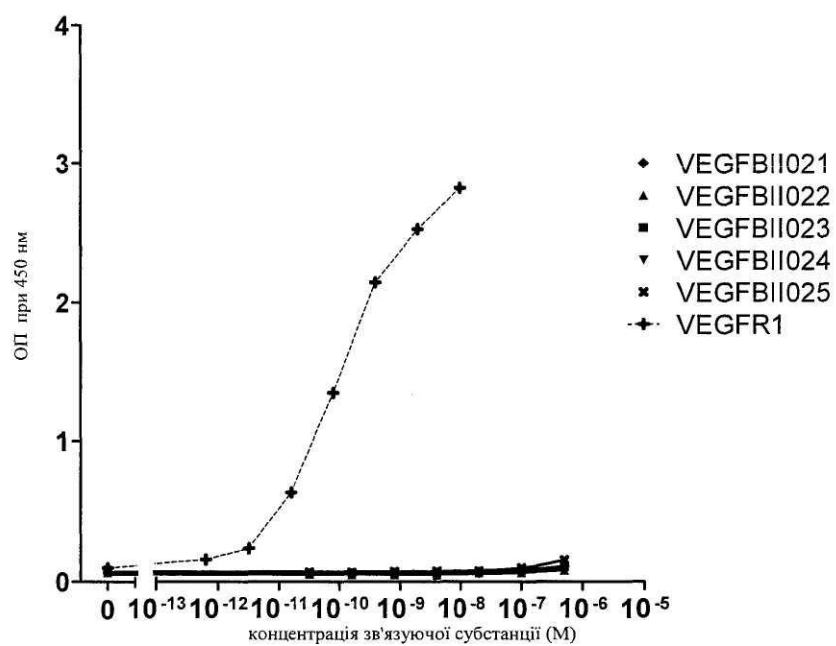
Г



Фіг. 14-5

Д

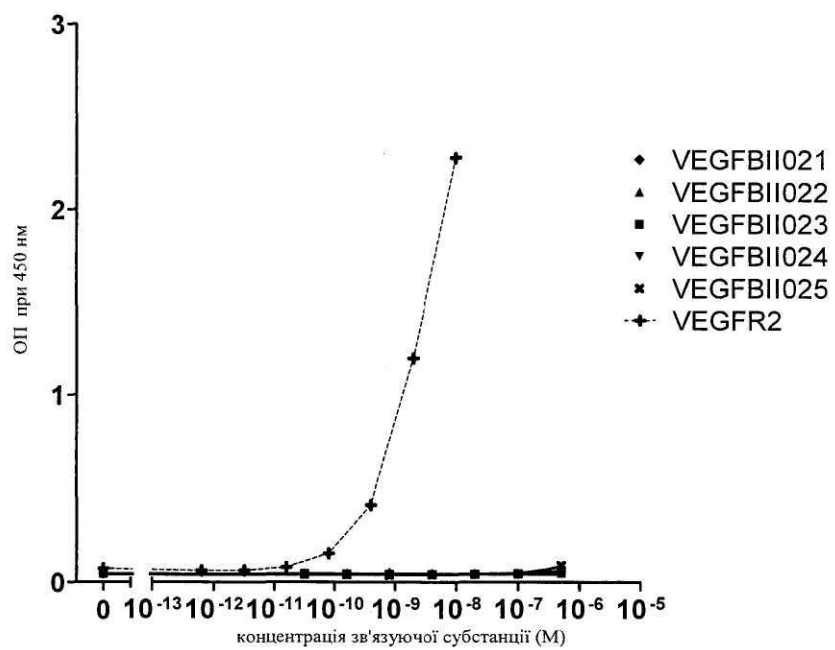
Зв'язування з VEGFB



Фіг. 14-6

Е

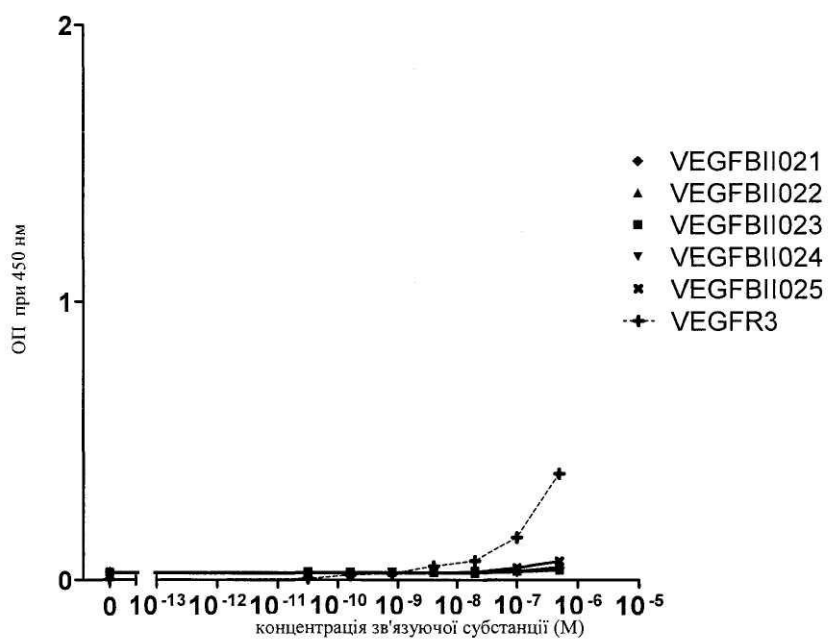
Зв'язування з VEGFC



Фіг. 14-7

Ж

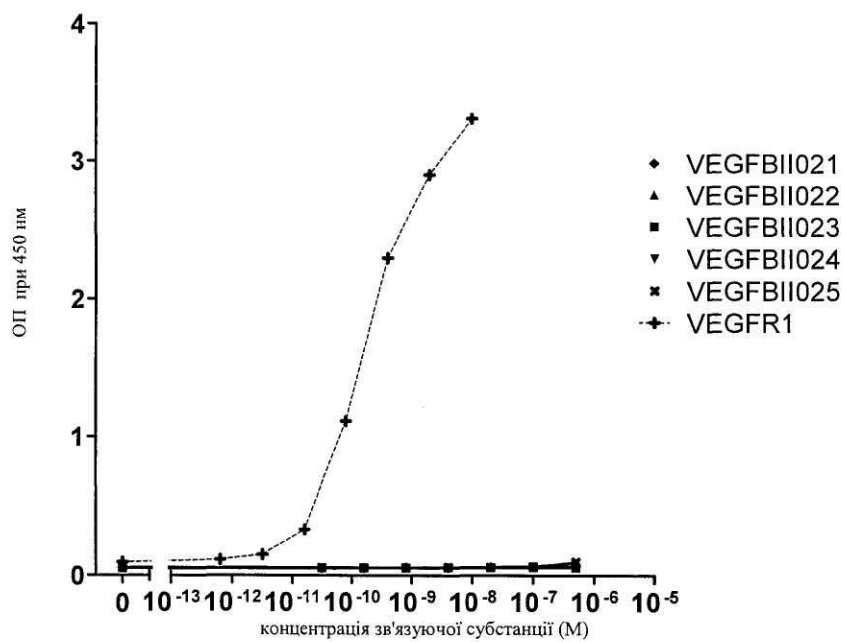
Зв'язування з VEGFD



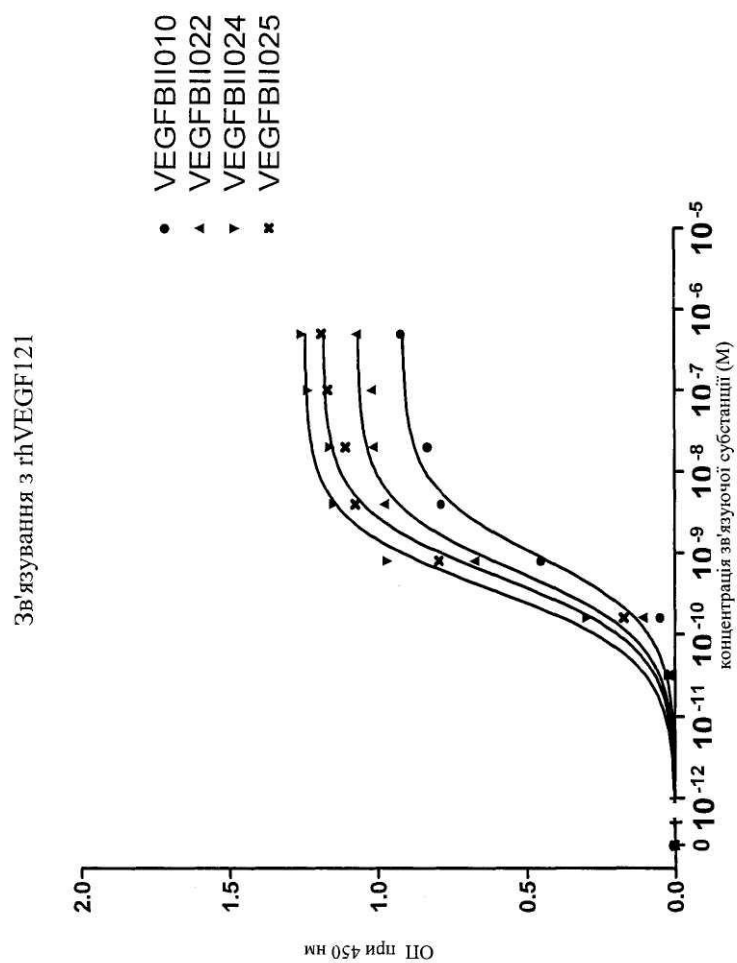
Фіг. 14-8

3

Зв'язування з PLGF



Фіг. 15



Фиг. 16

		10	20	30	40
Kabat#	:			
VH3-23/JH5	:	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQA			
VEGFBII23B04	:T.D.....EV..R.....S.G.F...			

		50	60	70	80
Kabat#	:a.....			
VH3-23/JH5	:	PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL			
VEGFBII23B04	:	Q..ER.F.V...-K..YK.DSV.LE.....K..A...V..			

		90	100	110
Kabat#	:	..abc..... abcdefghi..... ...		
VH3-23/JH5	:	QMNSLRAEDTAVYYCAK-----WGQGTLVTVSS		
VEGFBII23B04	:	.I...KP.....SSRAYGSSRLRLADTYEY.....Q.....		

Фиг. 17

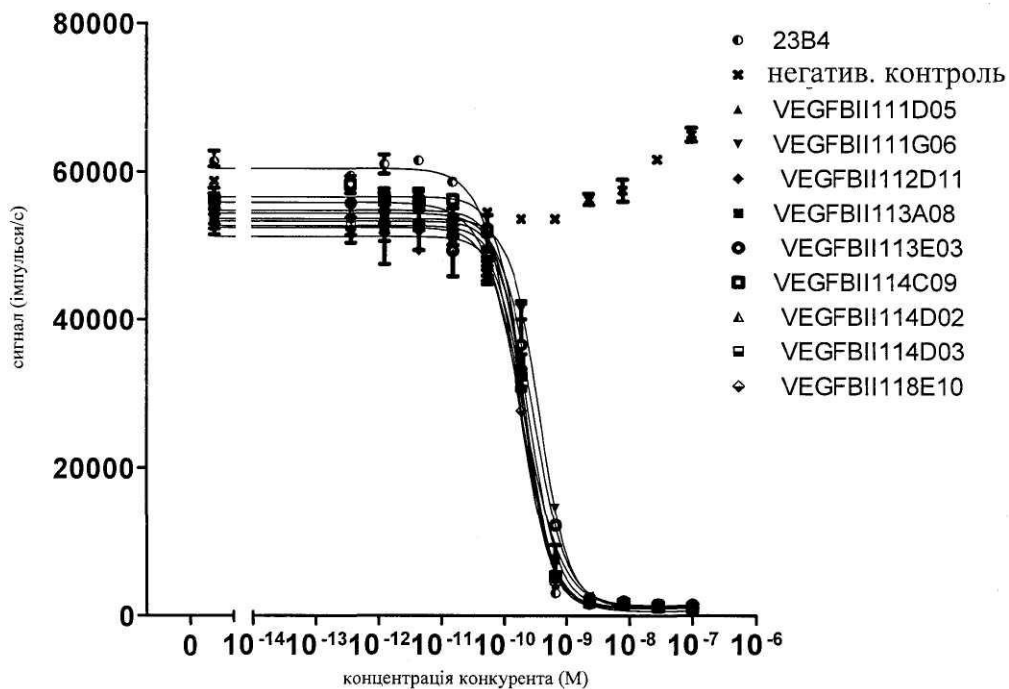
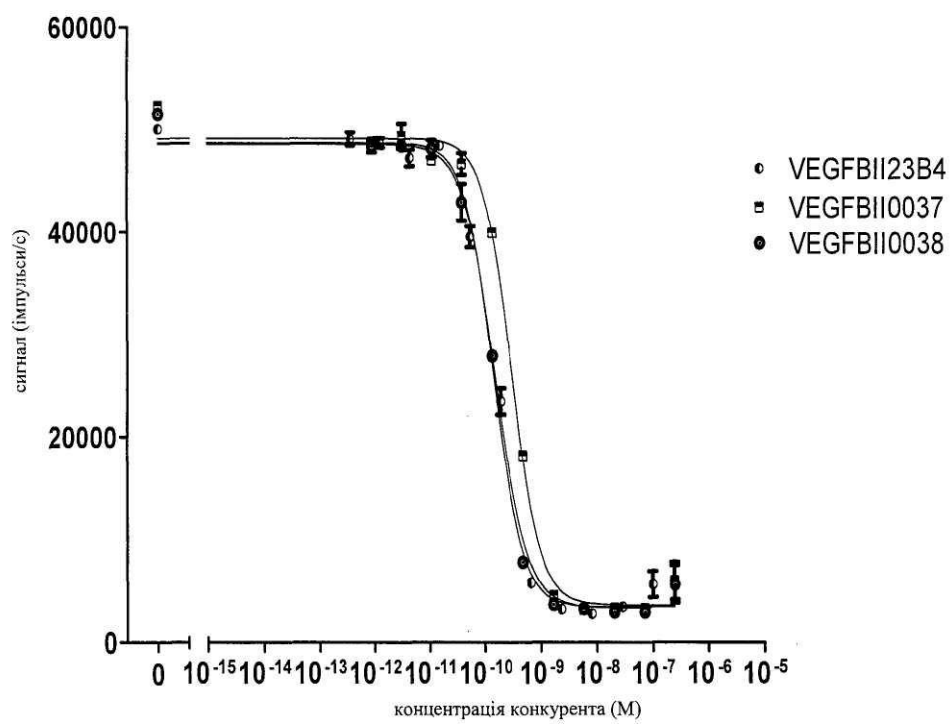


Fig. 18



Фиг. 19

	10	20	30	40
Kabat#	:		
VH3-23/JH5	:	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQA		
PVEGFBIIPMP5B5	: <u>V</u> ...IR.MSM.--.Y...		

	50	60	70	80
Kabat#	:a.....		
VH3-23/JH5	:	PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL		
PVEGFBIIPMP5B5	:	... <u>HR</u> .L.AR..-...T.A. <u>V</u>V..		

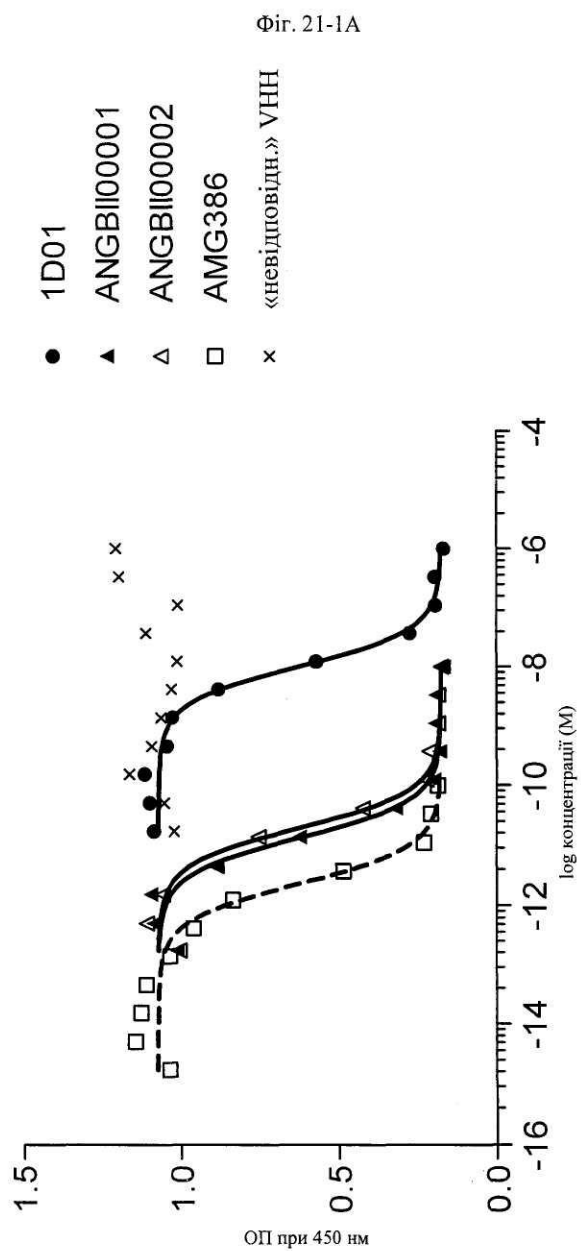
	90	101	110
Kabat#	:	..abc.....	
VH3-23/JH5	:	QMNSLRAEDTAVYYCAK-----WGQGTLVTVSS	
PVEGFBIIPMP5B5	: <u>K</u> A.....NTFSSRPNP.. <u>A</u> .. <u>Q</u>	

Фиг. 20

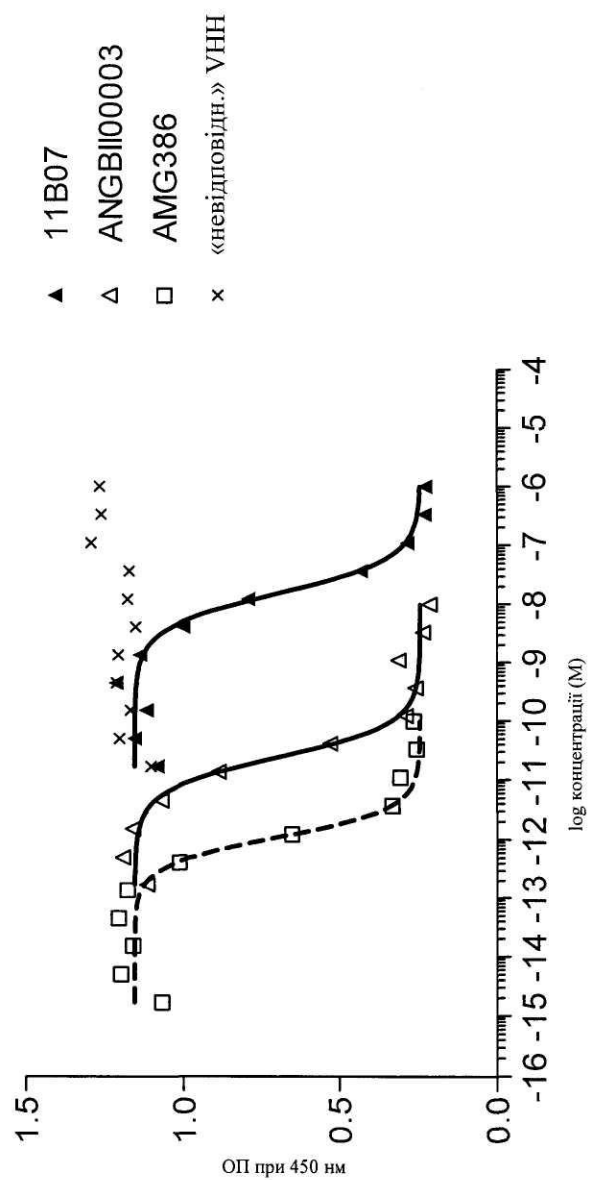
VHH ID	Формат	Опис
ANGBII00001		1D01-9gs-1D01
ANGBII00002		1D01-40gs-1D01
ANGBII00003		11B07-9gs-11B07
ANGBII00004		00027-9gs-00027
ANGBII00005		00027-40gs-00027
ANGBII00006		00908-9gs-00908

Позначення:

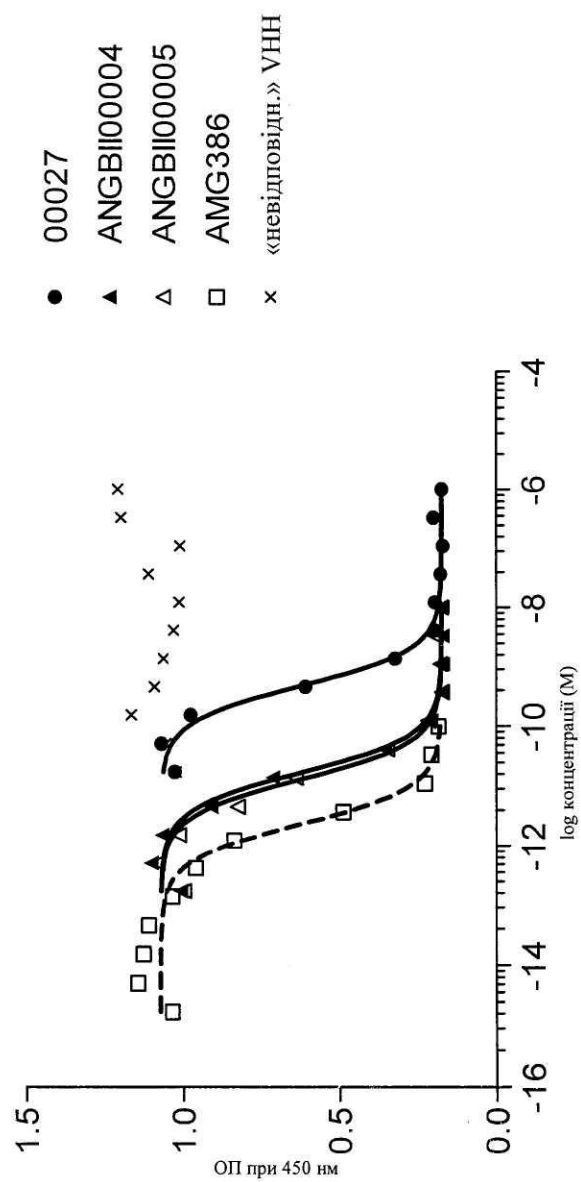
	Опис
	1D01
	11B07
	00027
	00908
	лінкер 9 <i>GlySer</i>
	лінкер 40 <i>GlySer</i>



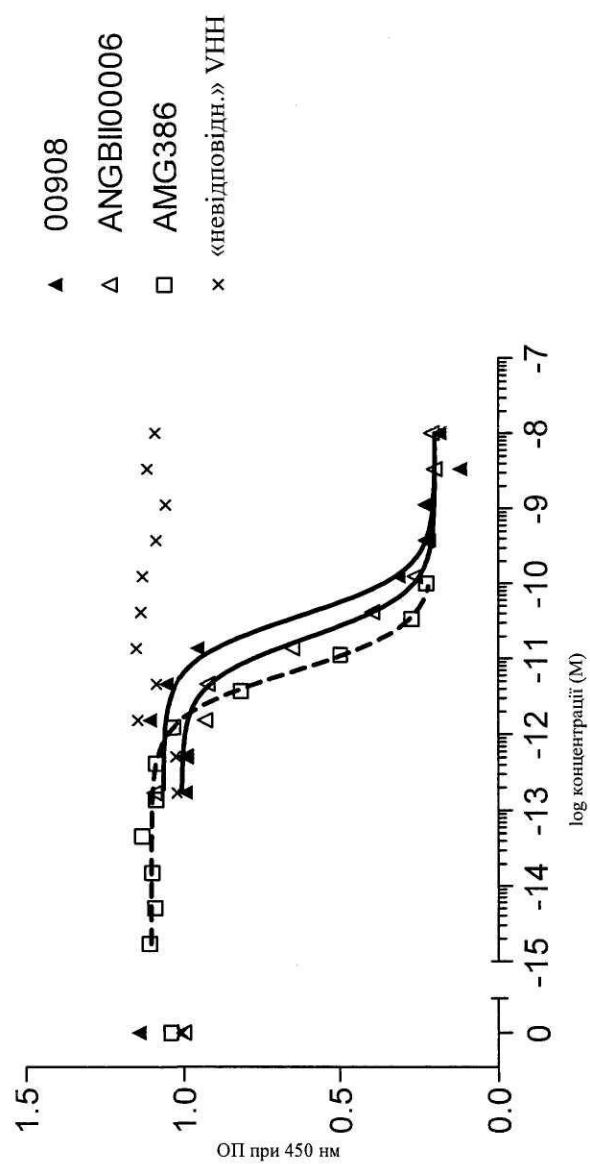
Фиг. 21-1Б



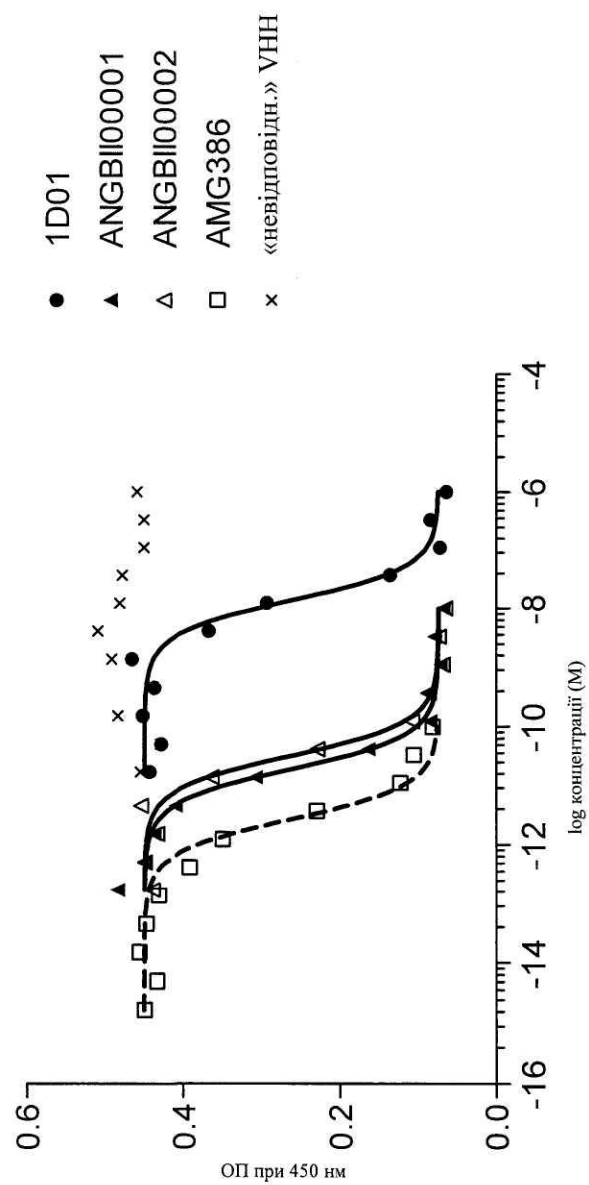
Фиг. 21-1В



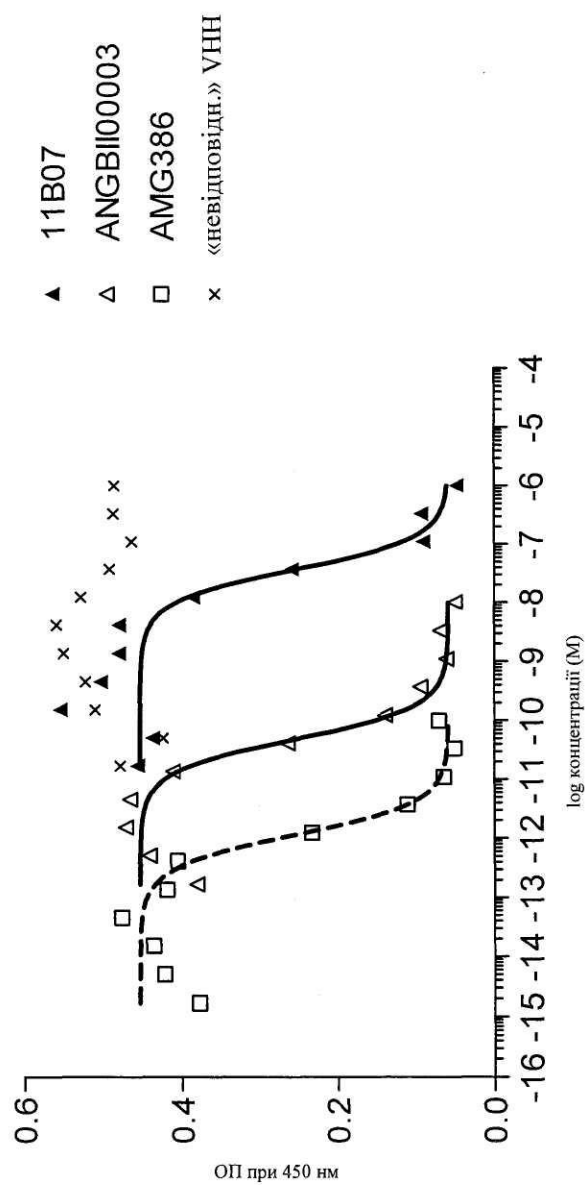
Фиг. 21-1Г



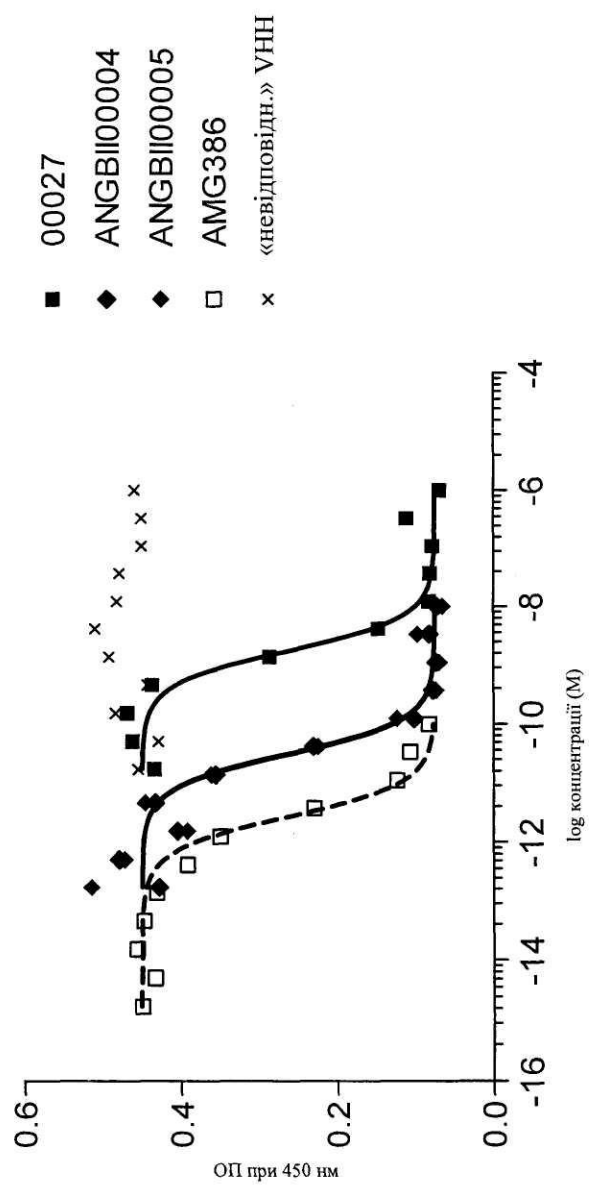
Фиг. 21-2А



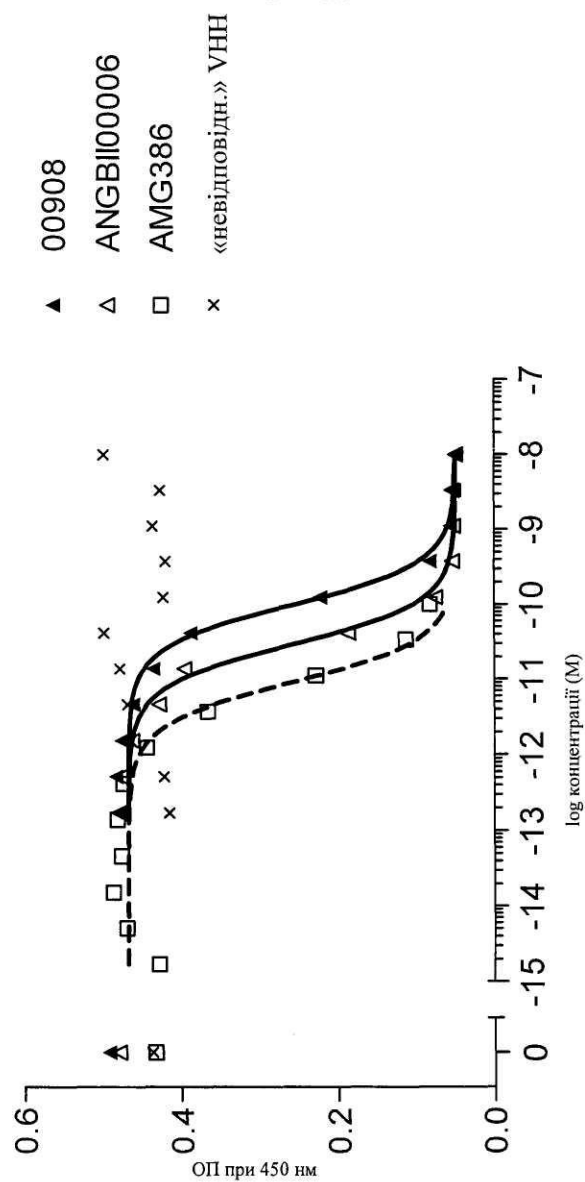
Фиг. 21-2Б



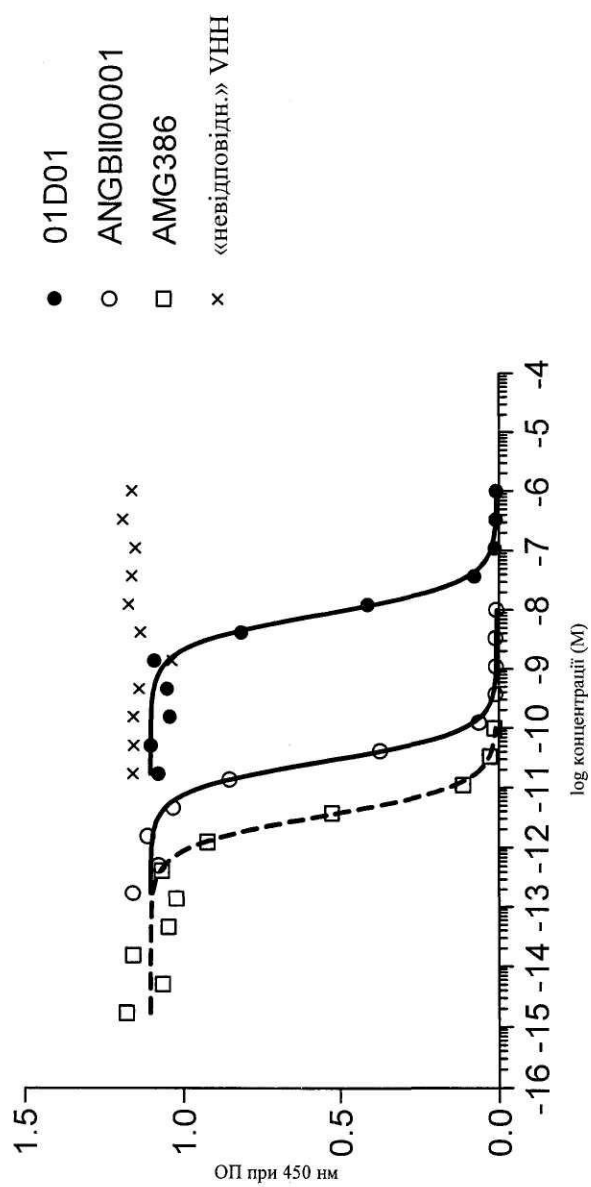
Фиг. 21-2В



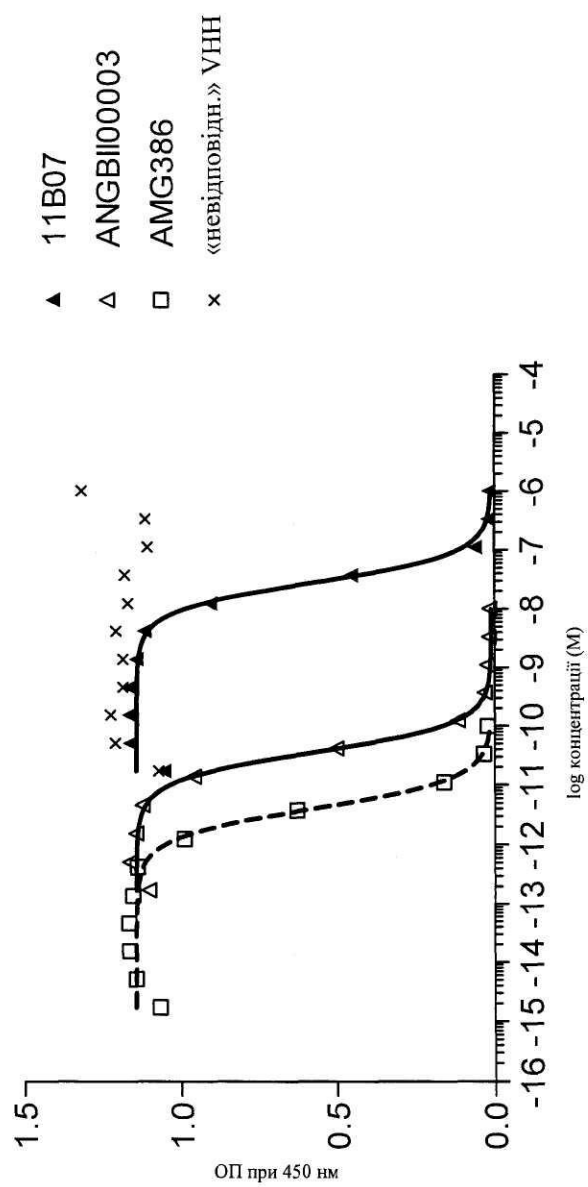
Фіг. 21-2Г



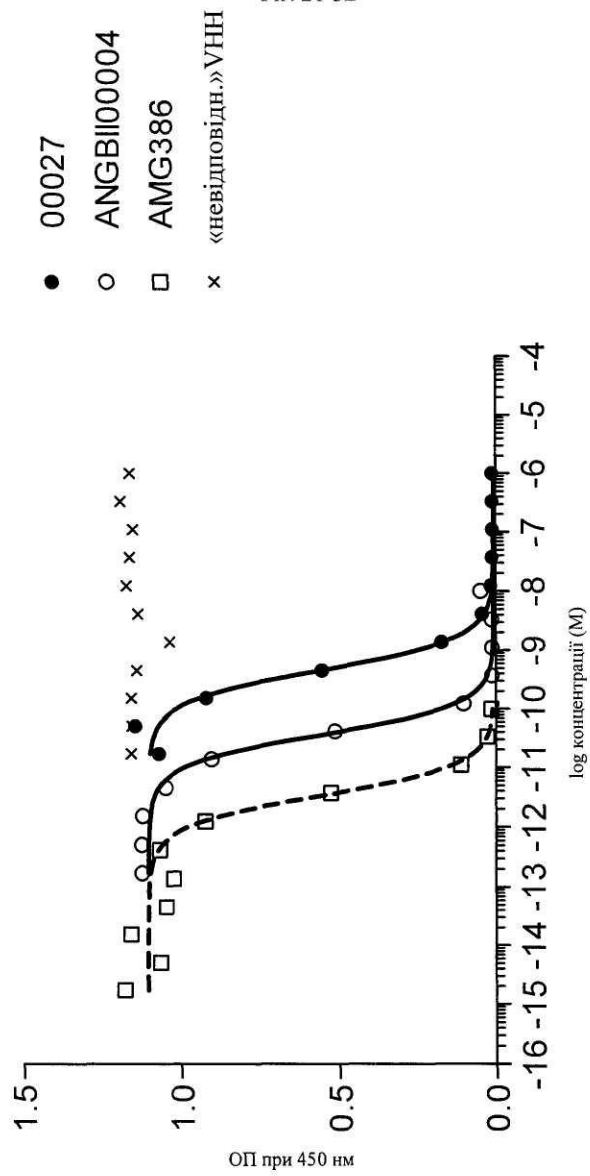
Фиг. 21-3А



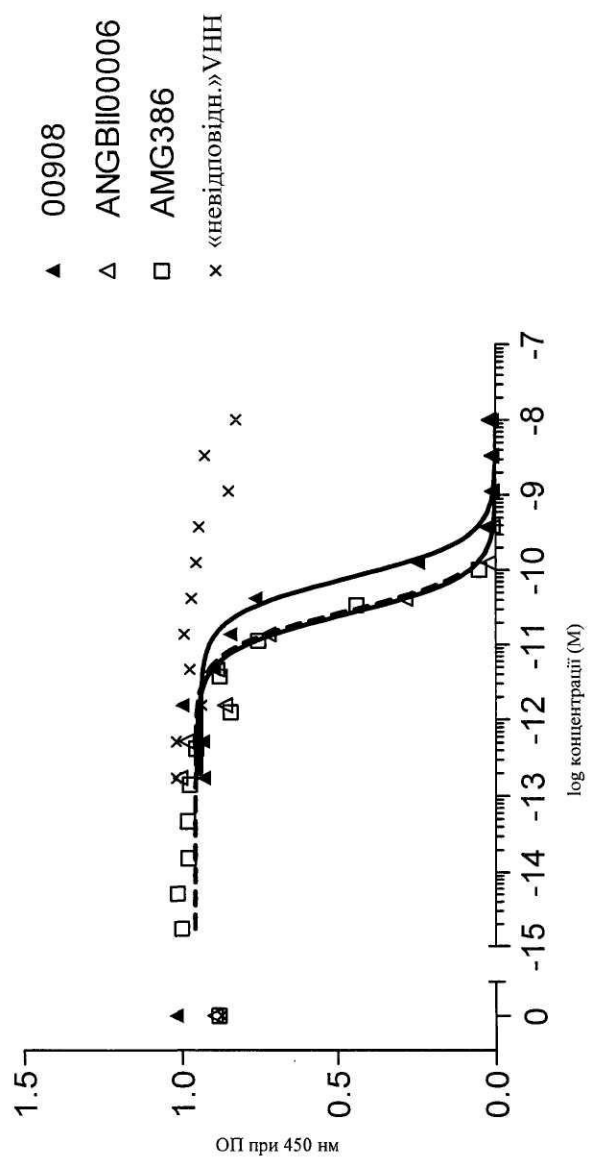
Фіг. 21-3Б



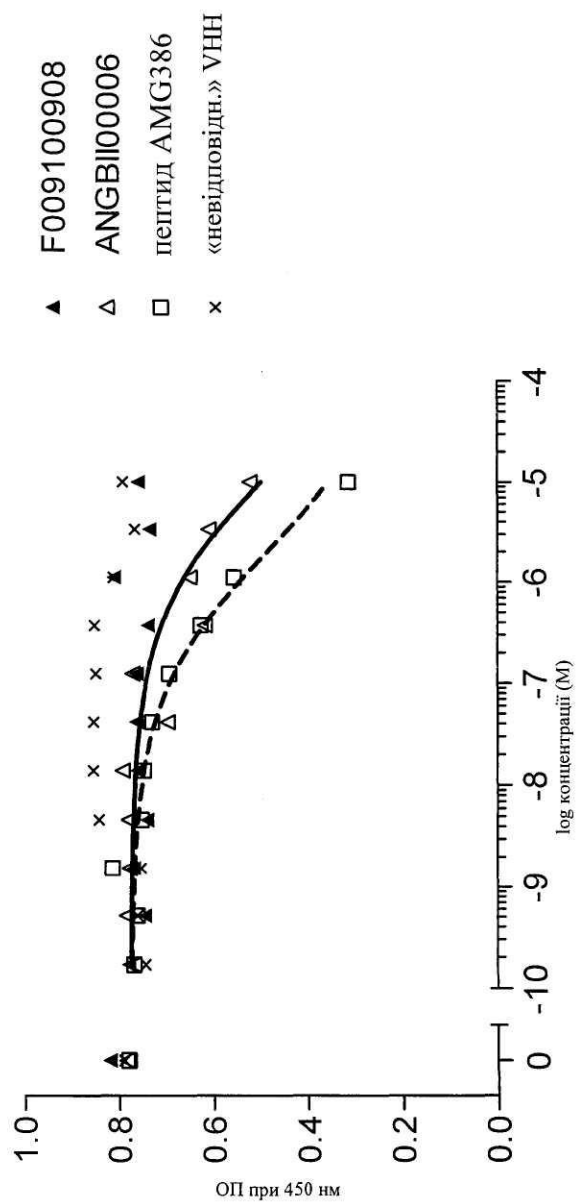
Фиг. 21-3В







Фиг. 21-3Г



Фиг. 22



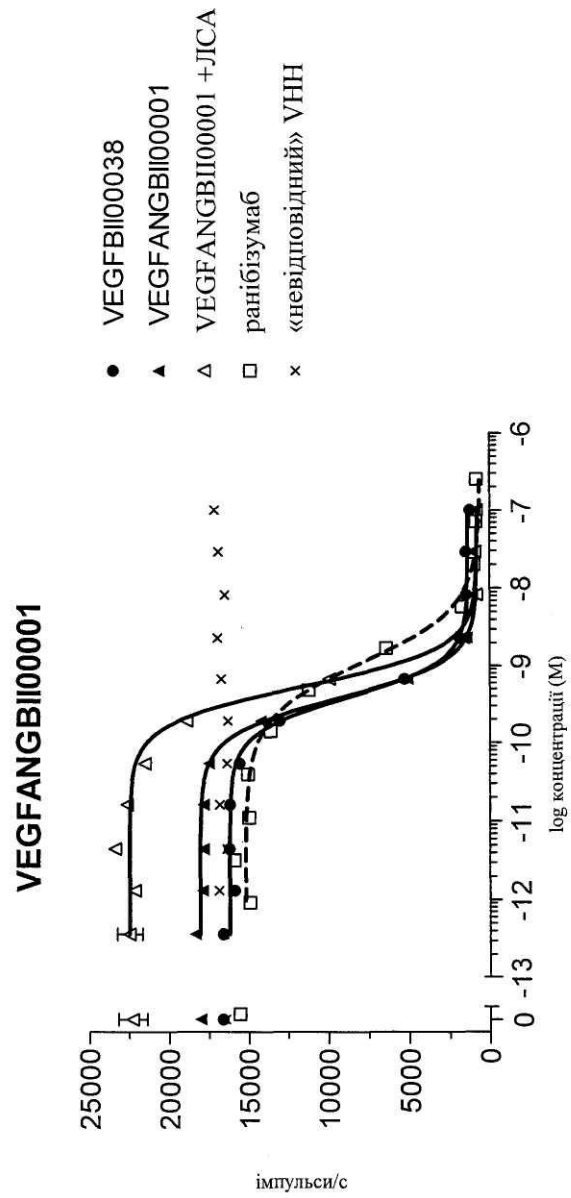
Фіг. 23

VHH ID	Формат	Опис
VEGFANGBII00001		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00027
VEGFANGBII00002		00027-9gs-ALB11-9gs-VEGFBII00038
VEGFANGBII00003		00027-9gs-VEGFBII00038-9gs-ALB11
VEGFANGBII00004		VEGFBII00038-AAA-ALB11-AAA-00027

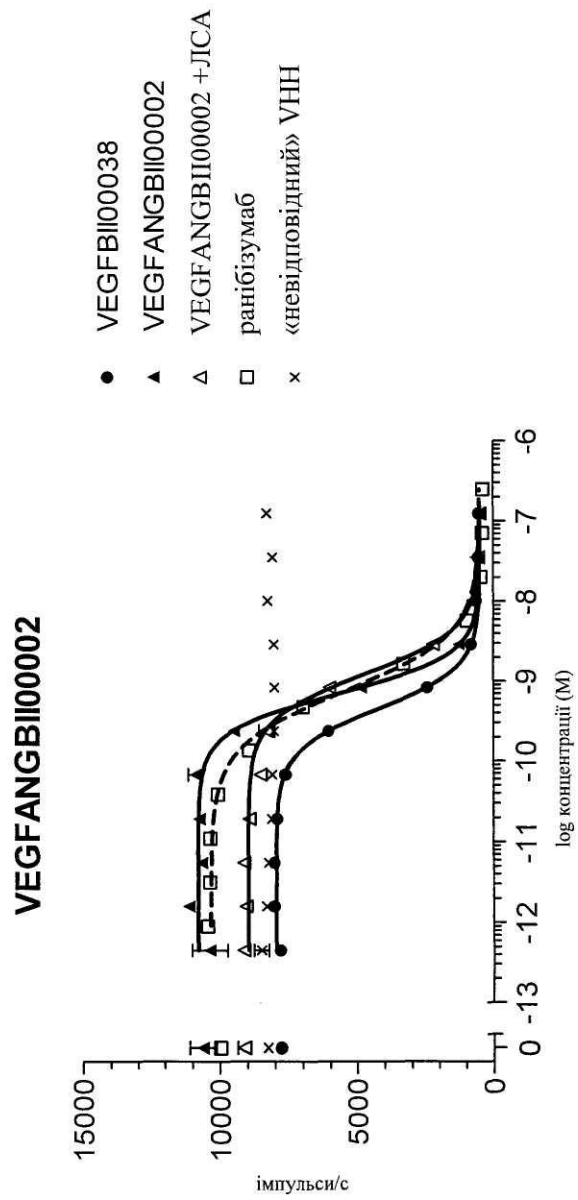
Позначення:

	Опис
	VEGFBII00038
	00027
	ALB11
AAA	Потрійний <i>Ala</i> -лінкер
	лінкер <i>9 GlySer</i>

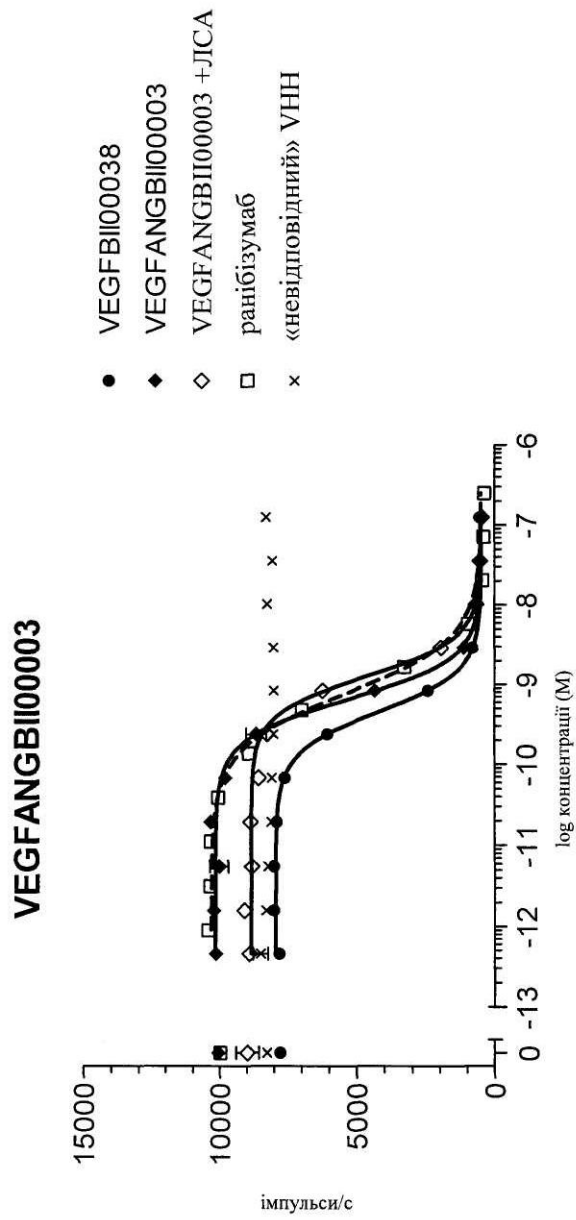
Фиг. 24А



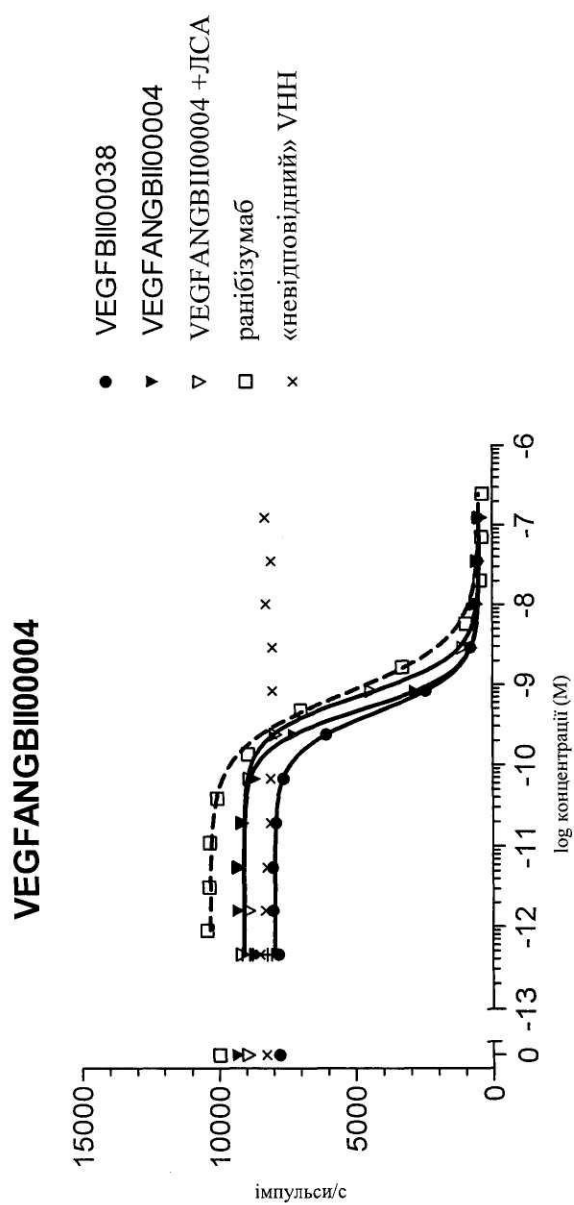
Фіг. 24Б



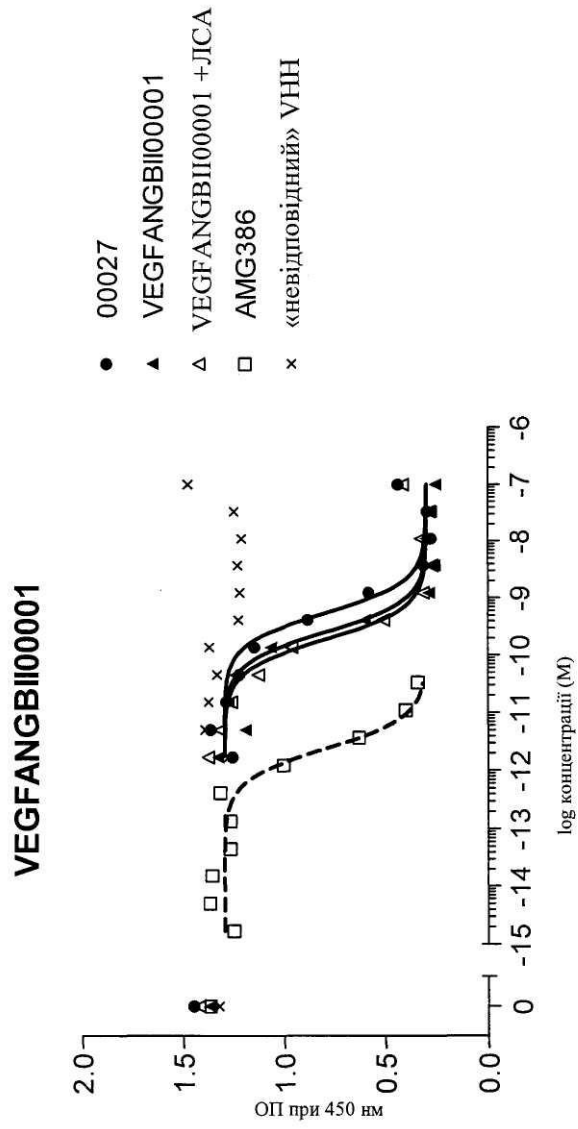
Фіг. 24В



Фіг. 24Г

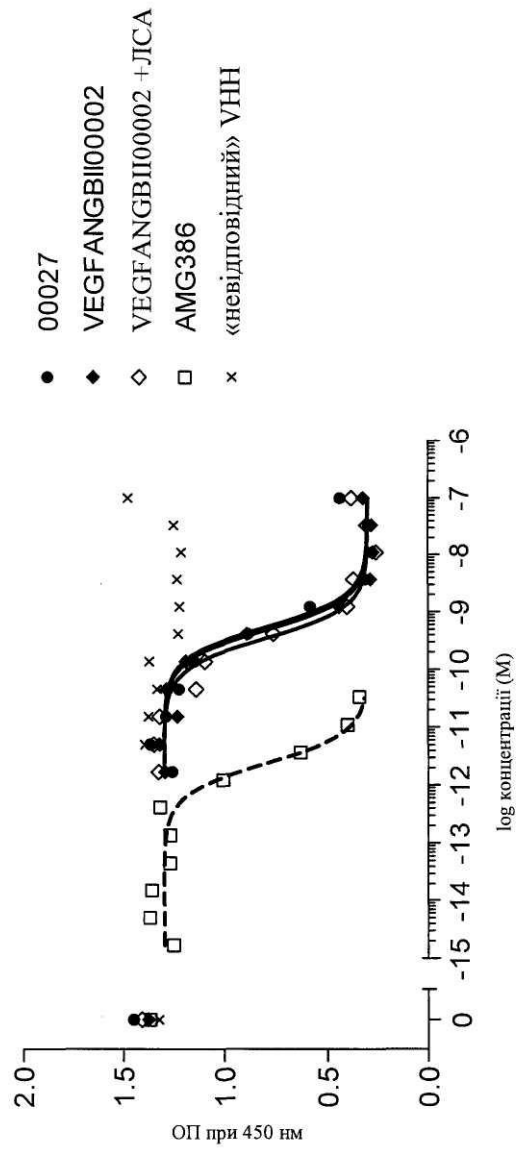


Фіг. 25А

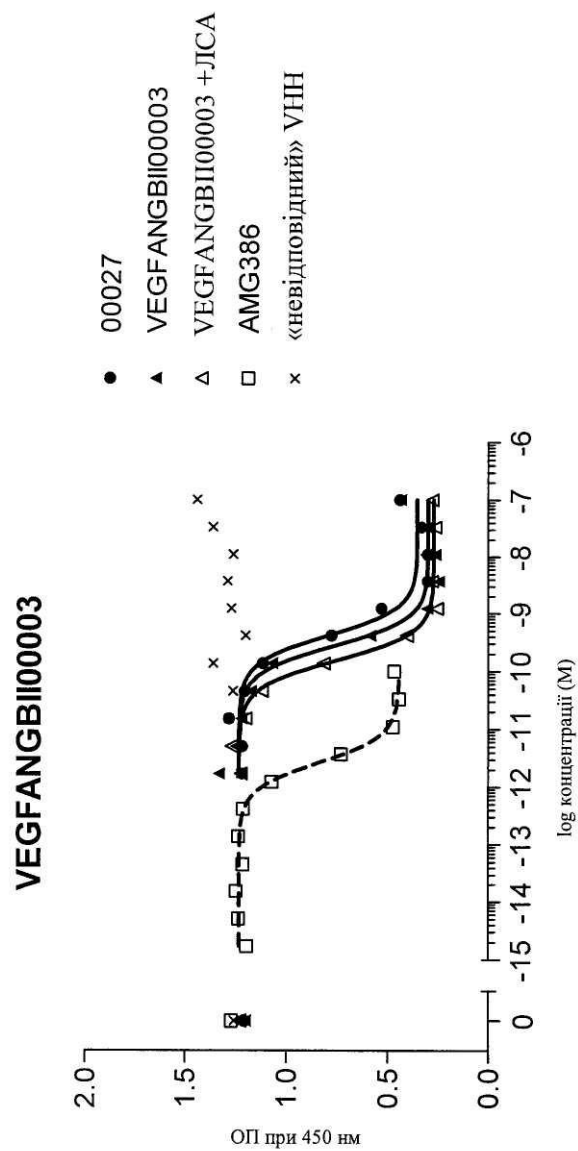


Фір. 25Б

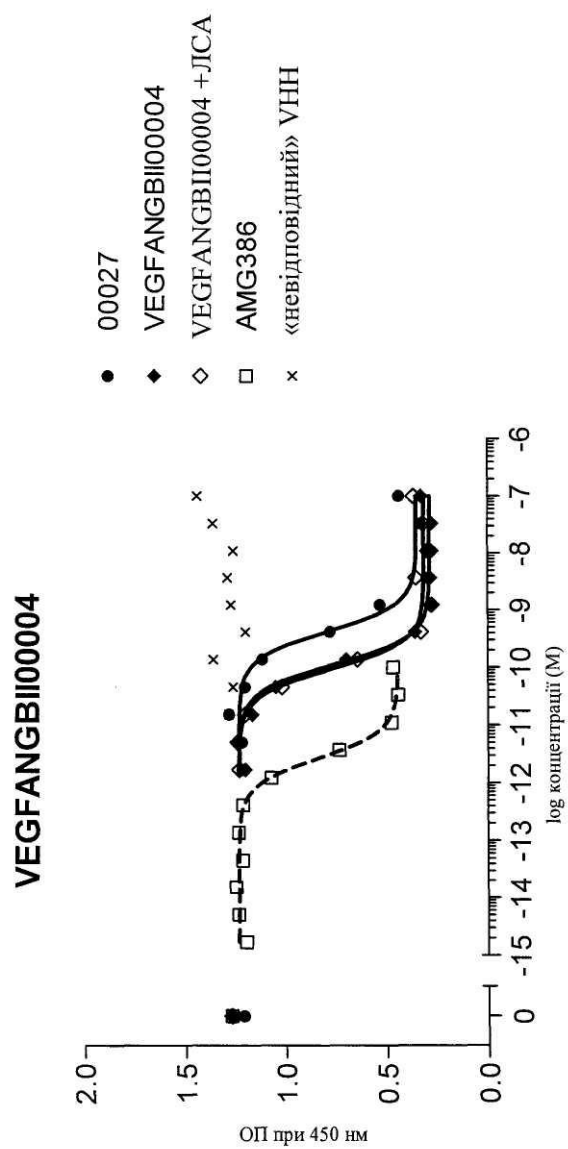
VEGFANGBI000002








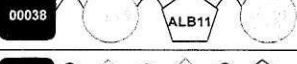
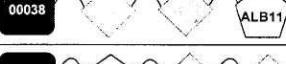
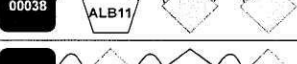
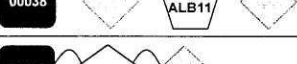
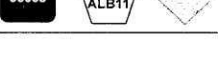
Фіг. 25В









Фіг. 25Г



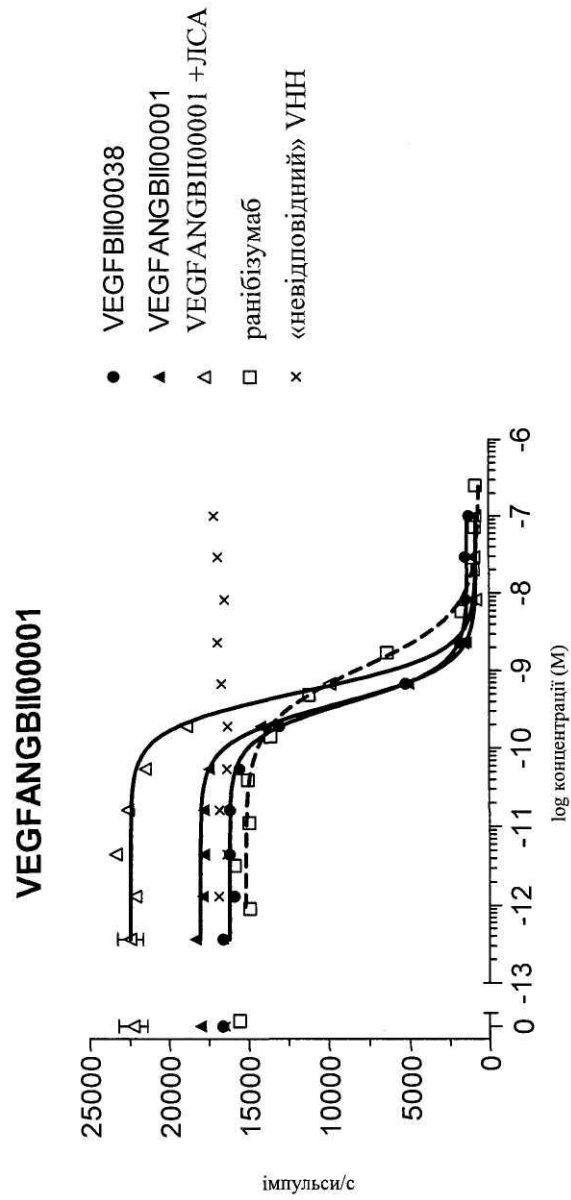
Фіг. 26

VHH ID	Формат	Опис
VEGFANGBII00005		VEGFBII00038-9gs-7G08-9gs-ALB11
VEGFANGBII00006		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-7G08
VEGFANGBII00007		VEGFBII00038-9gs-7G08-9gs-ALB11-9gs-7G08
VEGFANGBII00008		VEGFBII00038-9gs-00027-9gs-00027-9gs-ALB11
VEGFANGBII00009		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00027-9gs-00027
VEGFANGBII00010		VEGFBII00038-9gs-00027-9gs-ALB11-9gs-00027
VEGFANGBII00011		VEGFBII00038-9gs-1D01-9gs-1D01-9gs-ALB11
VEGFANGBII00012		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-1D01-9gs-1D01
VEGFANGBII00013		VEGFBII00038-9gs-1D01-9gs-ALB11-9gs-1D01
VEGFANGBII00014		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-1D01

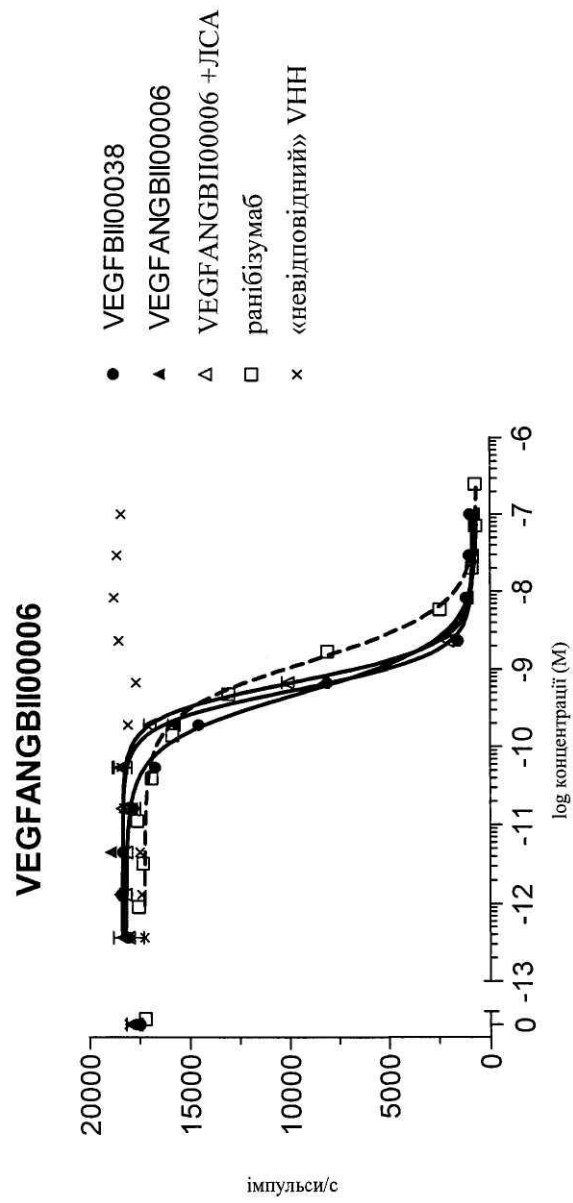
Позначення:

	Опис		Опис
	VEGFBII00038		ALB11
	00027	AAA	потрійний Ala-лінкер
	1D01		лінкер 9 GlySer
	7G08		

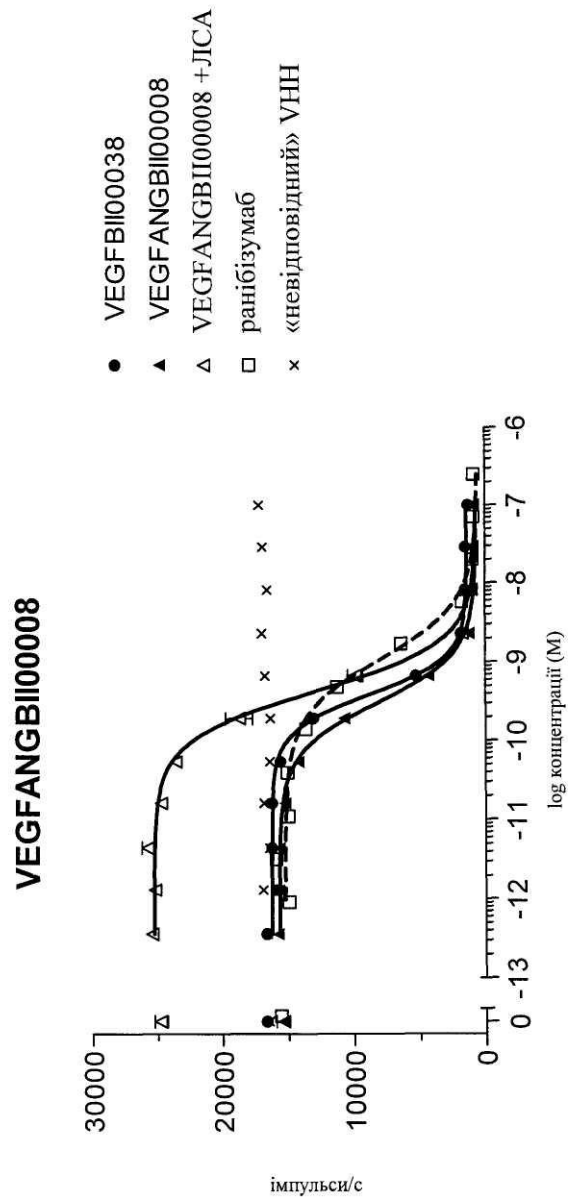
Фіг. 27-1А



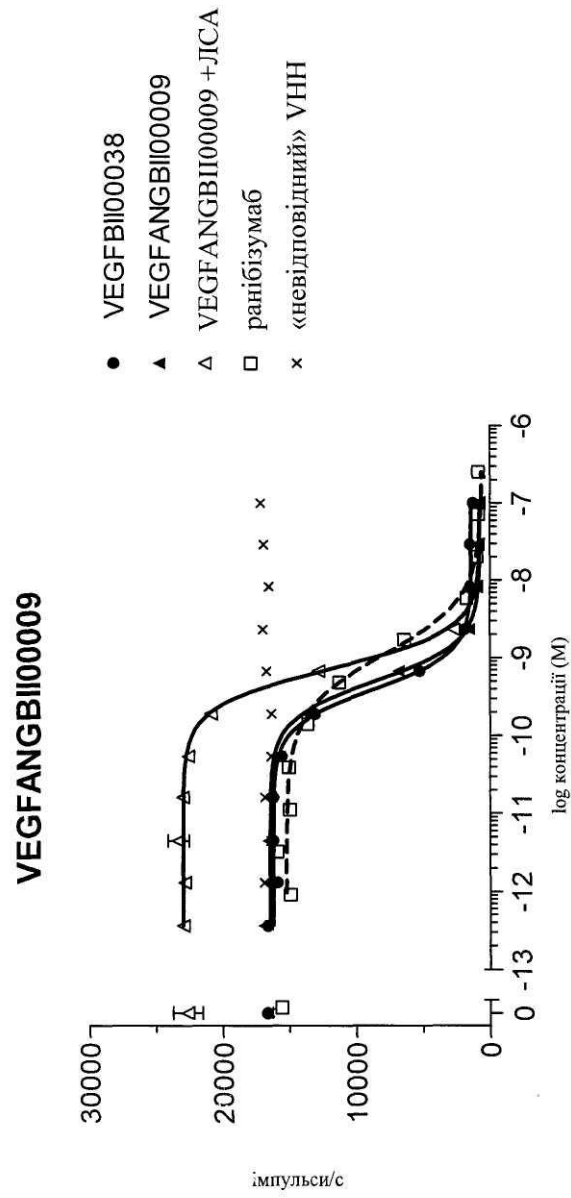
Фиг. 27-1Б



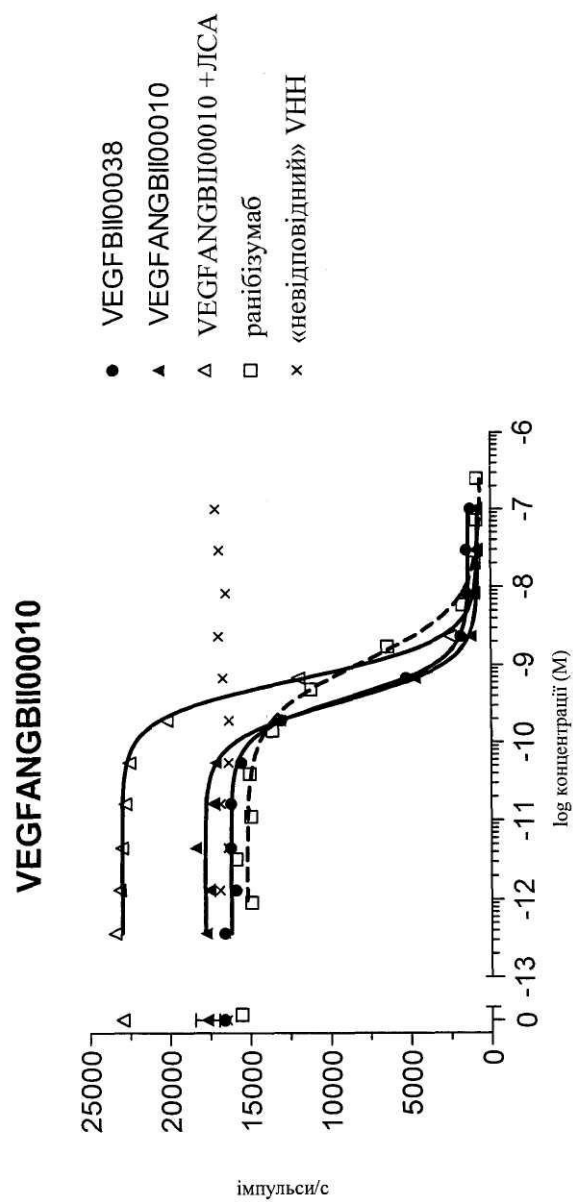
Фиг. 27-1В



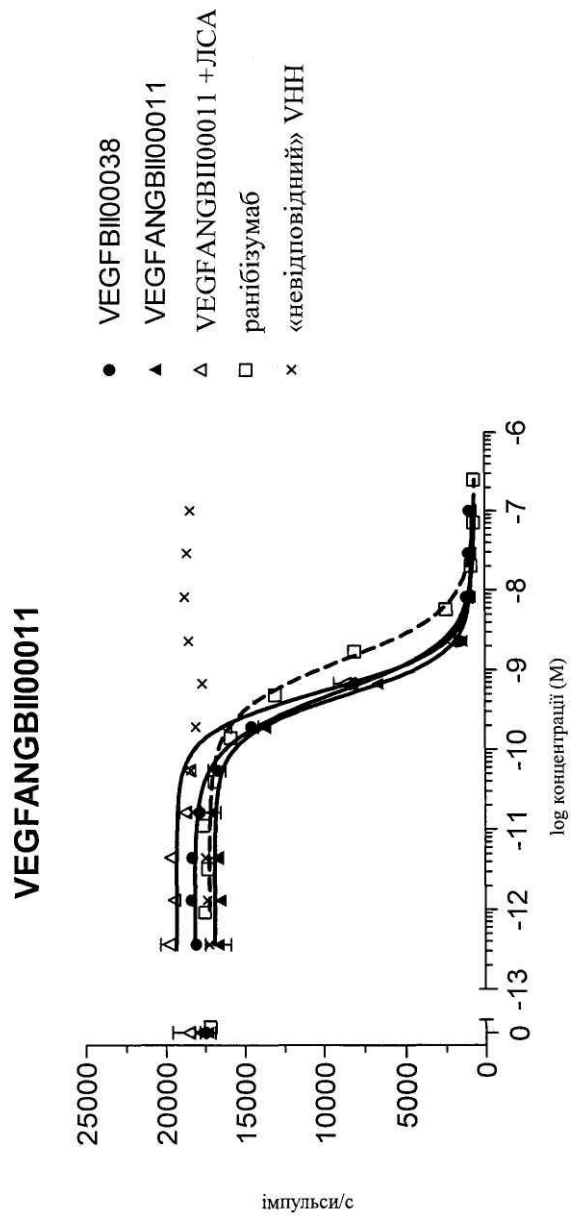
Фиг. 27-1Г



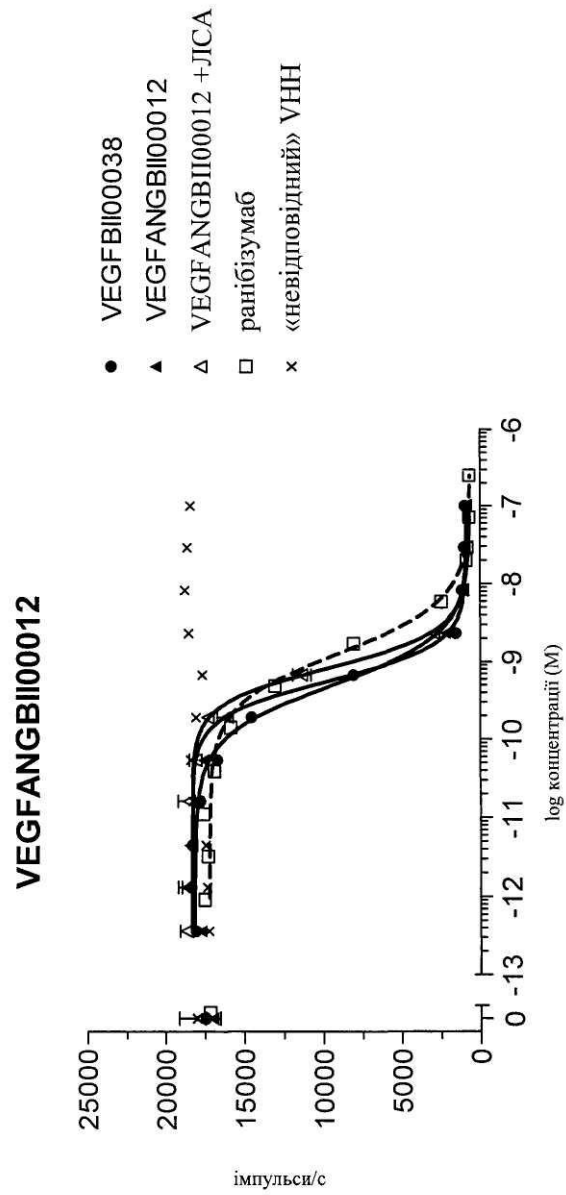
Фіг. 27-1Д



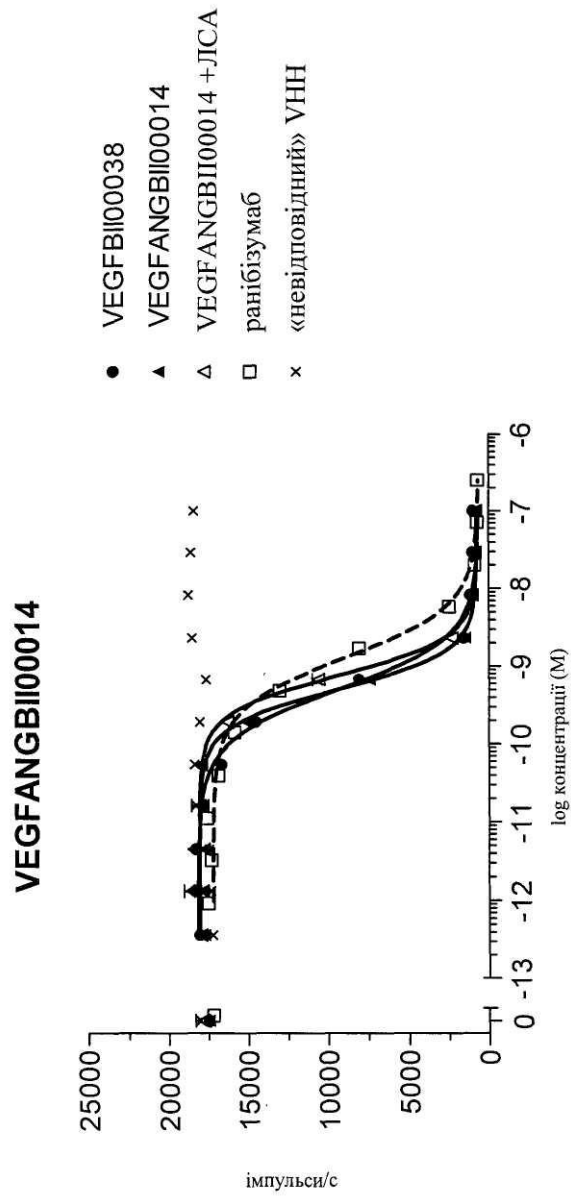
Фіг. 27-1Е



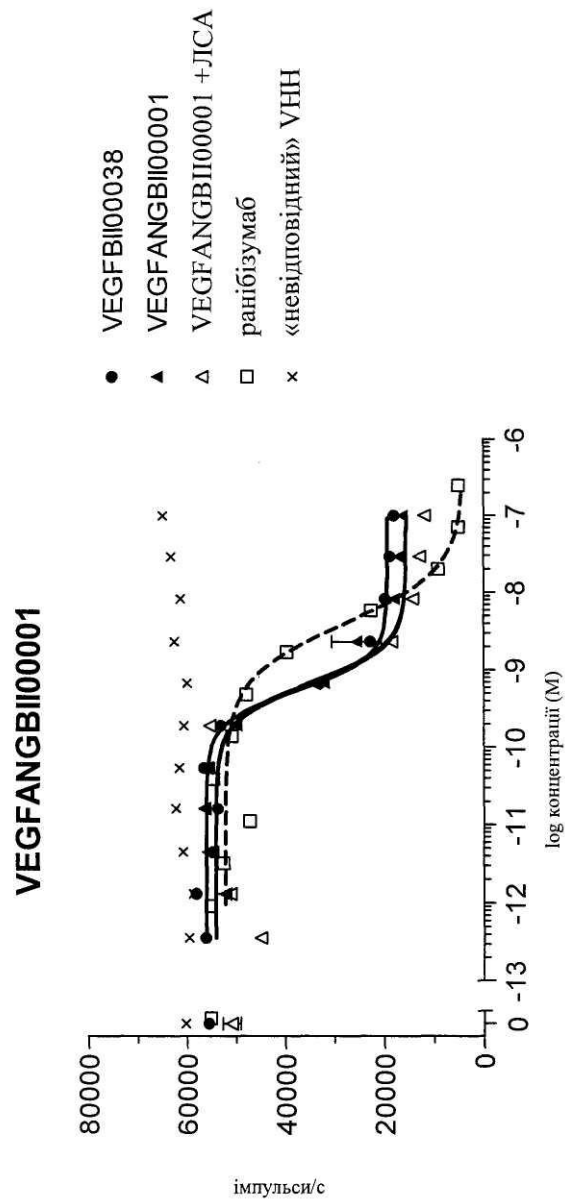
Фиг. 27-1Ж



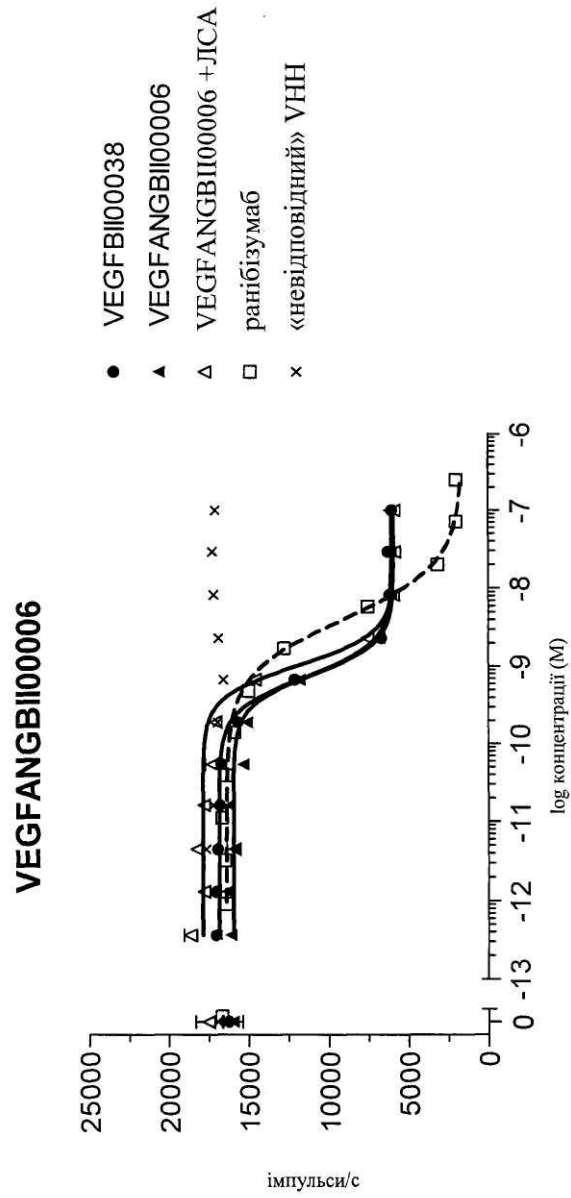
Фіг. 27-13



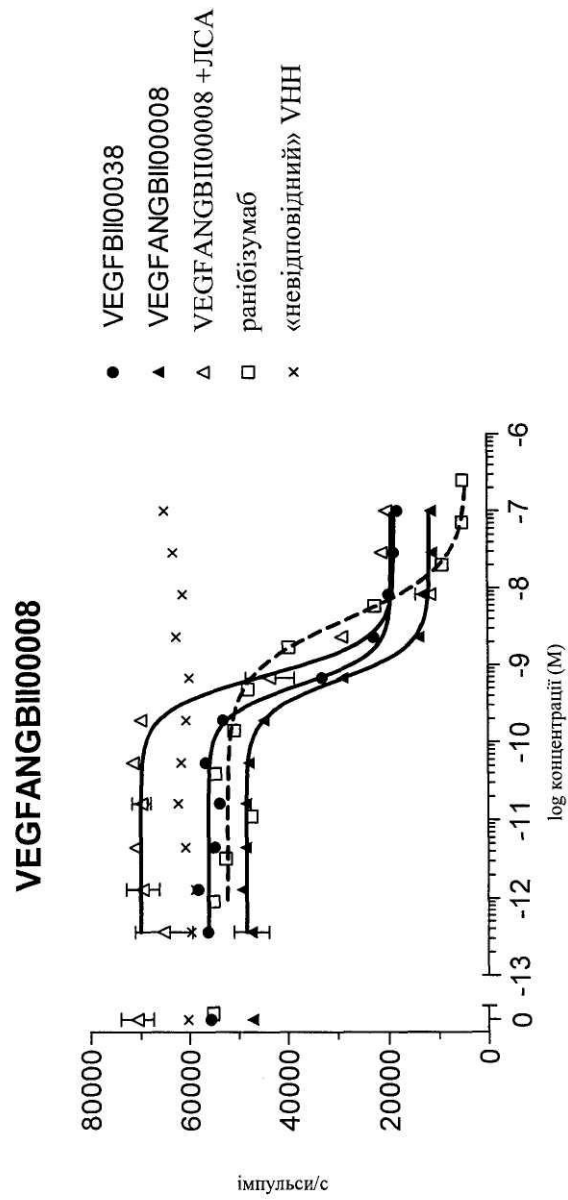
Фіг. 27-2А



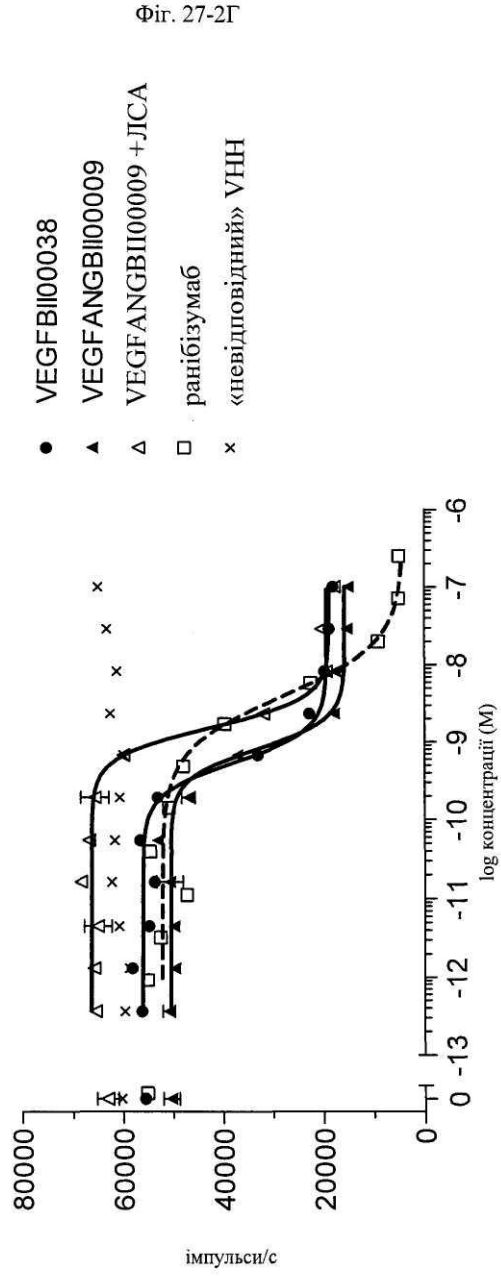
Фіг. 27-2Б



Фір. 27-2В

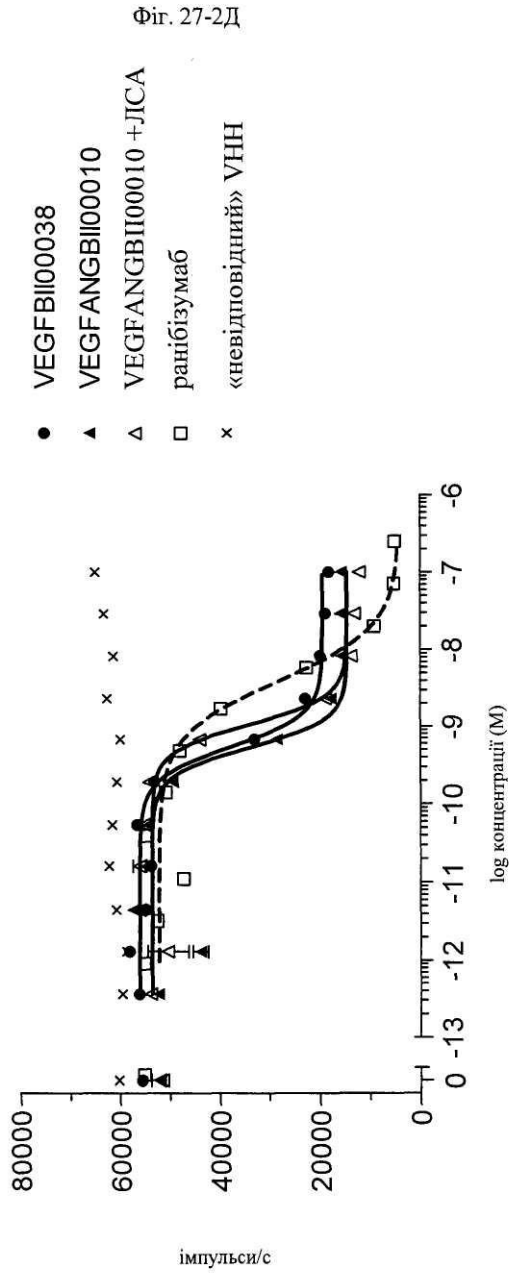


VEGFANGBI00009

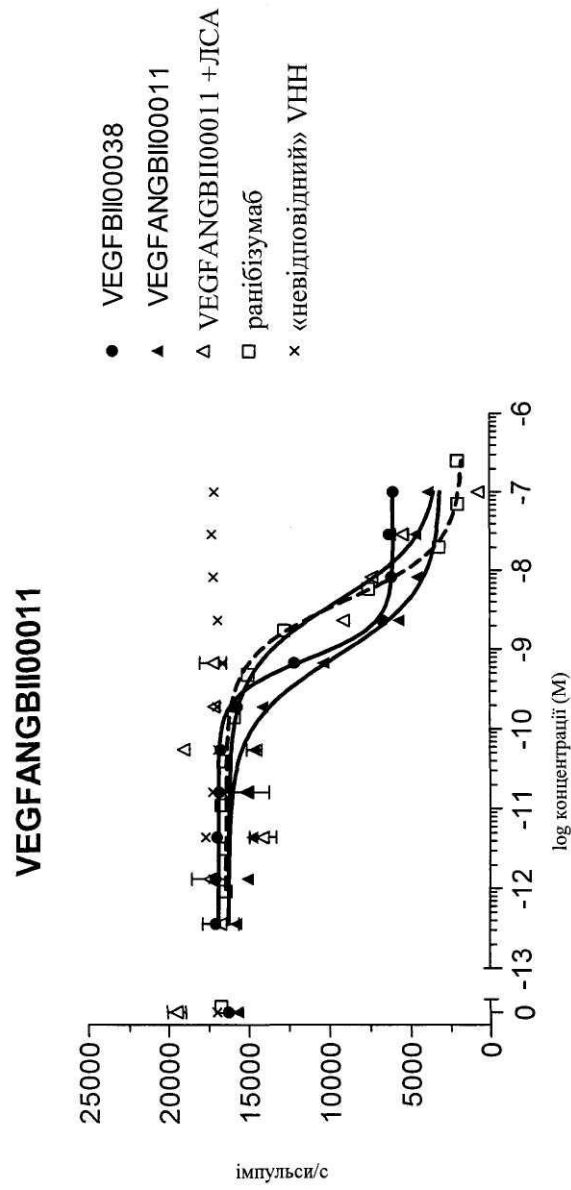


Φir. 27-2Г

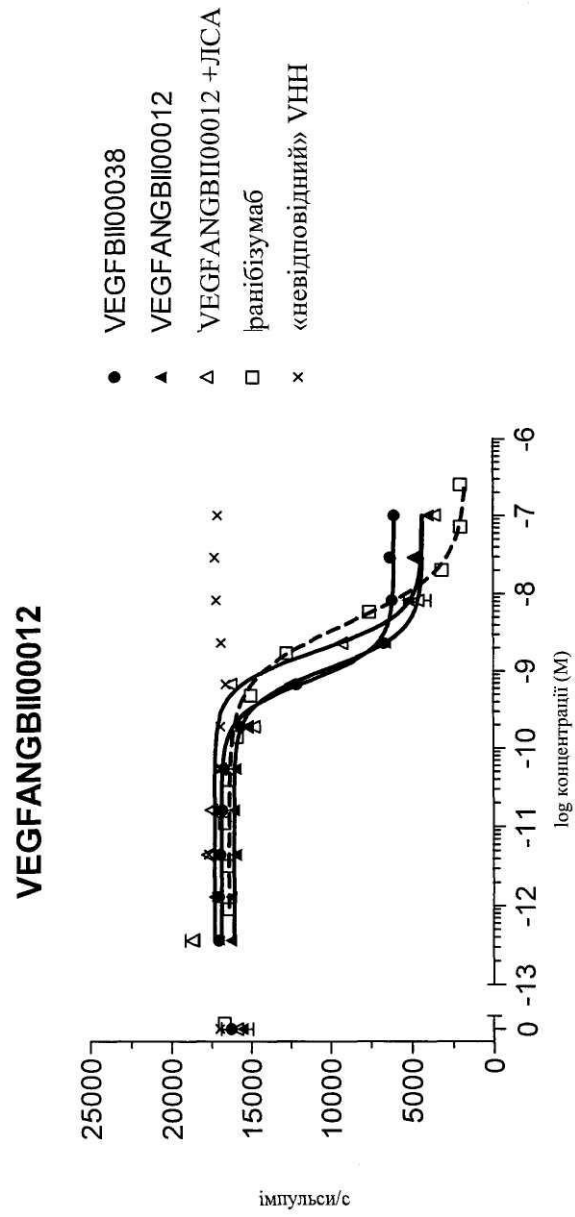
VEGFANGBI00010



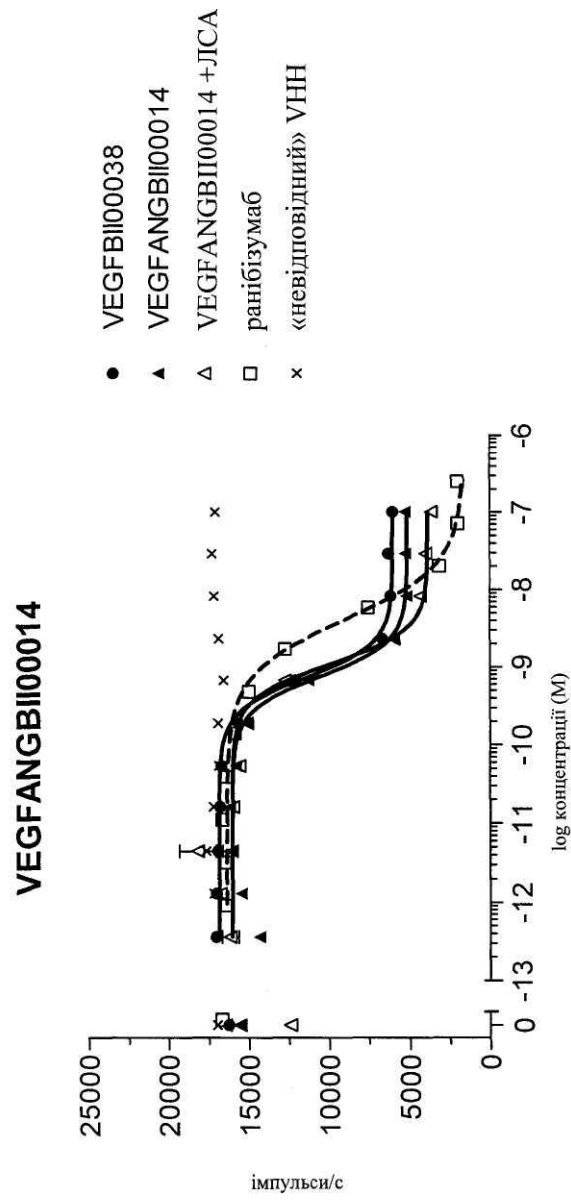
Фіг. 27-2Е



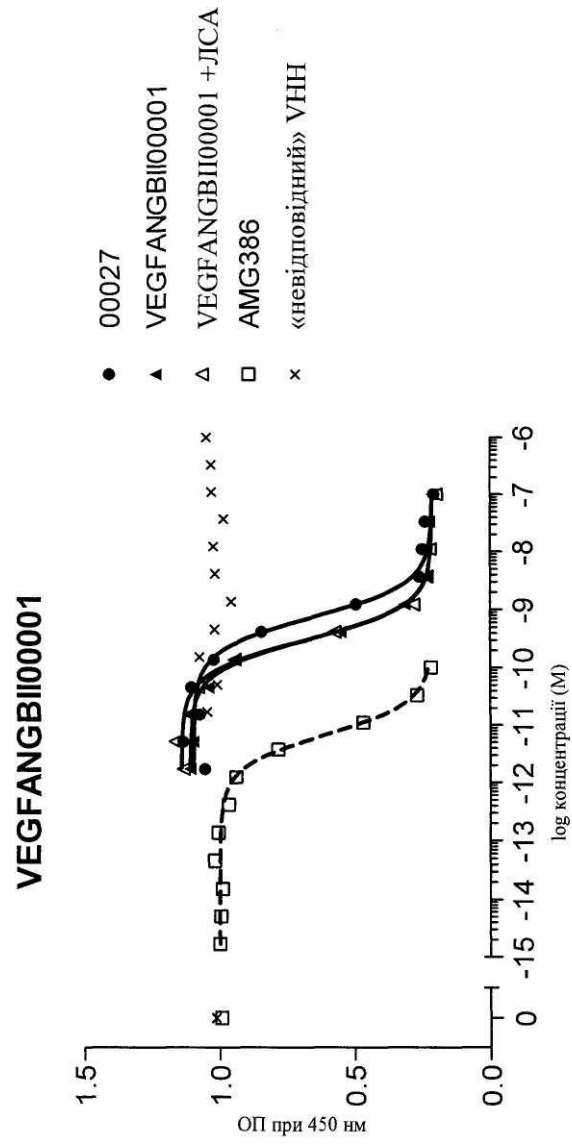
Фіг. 27-2Ж



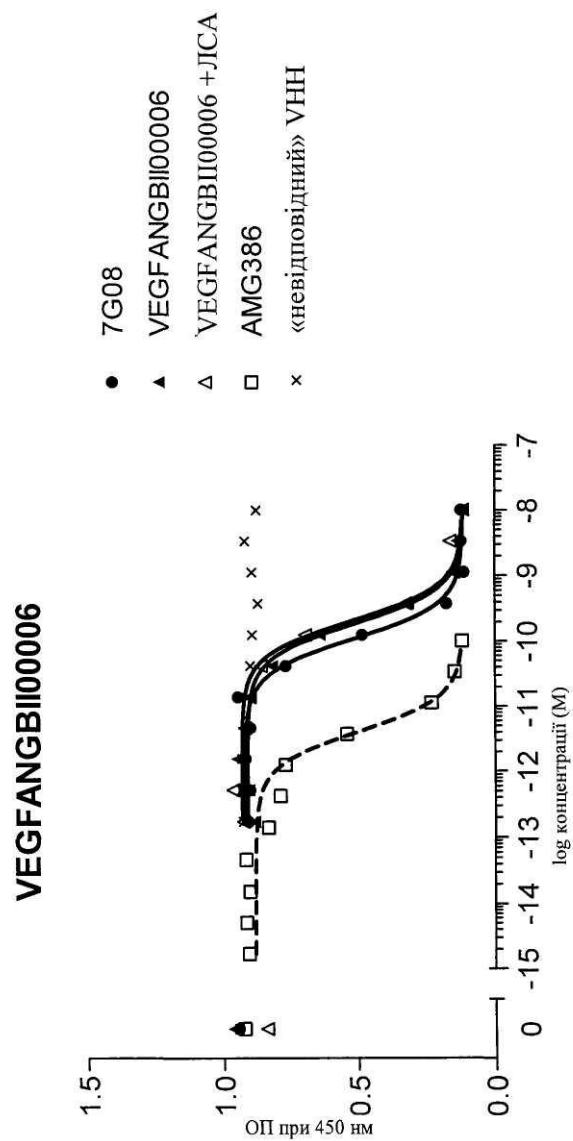
Фиг. 27-23



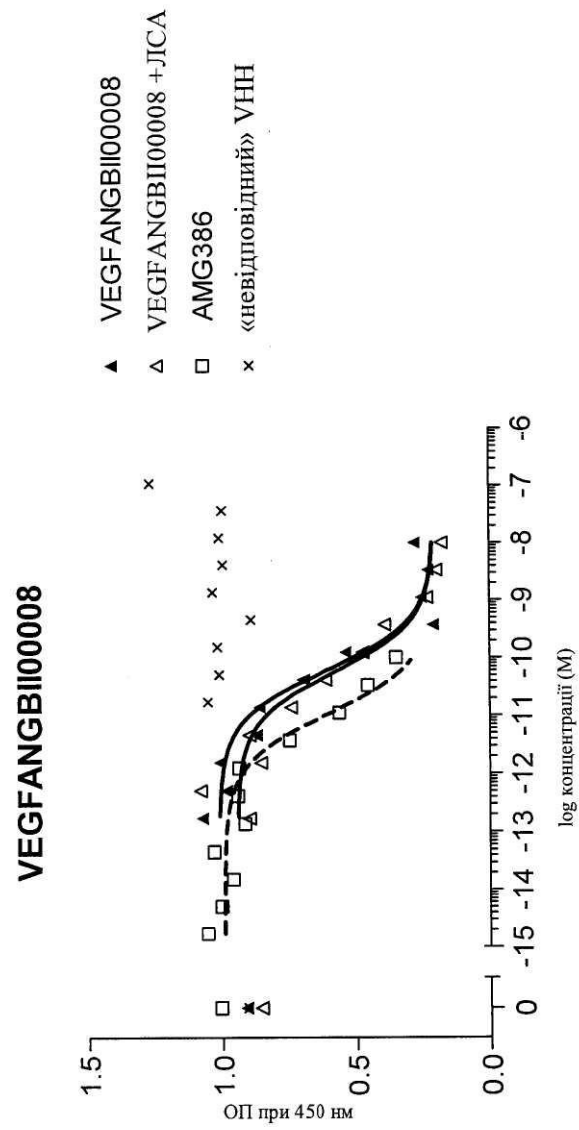
Фір. 28-1А



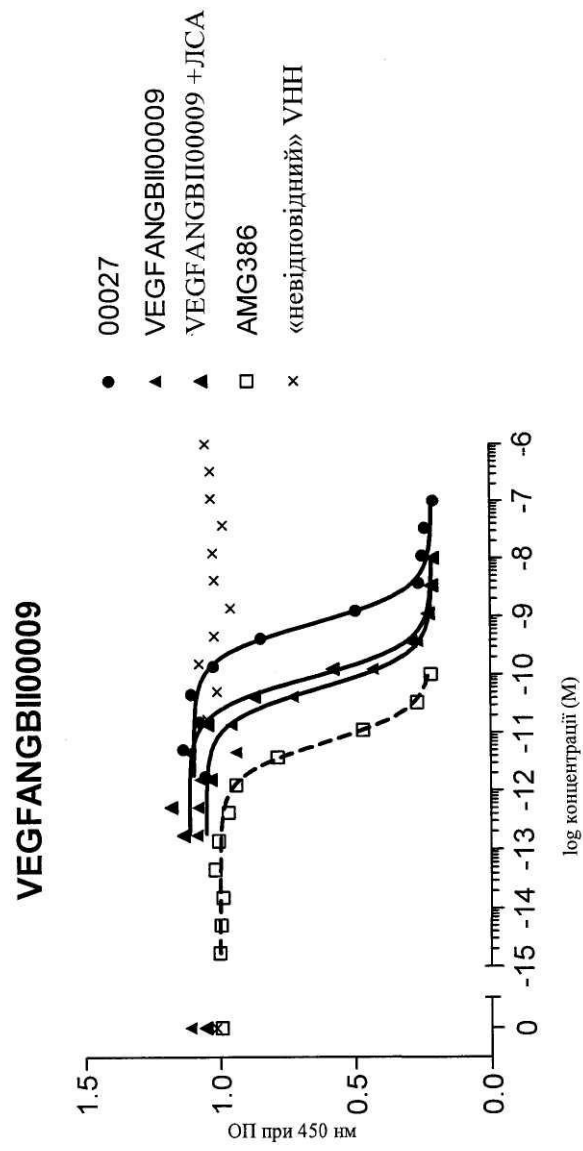
Фиг. 28-1Б



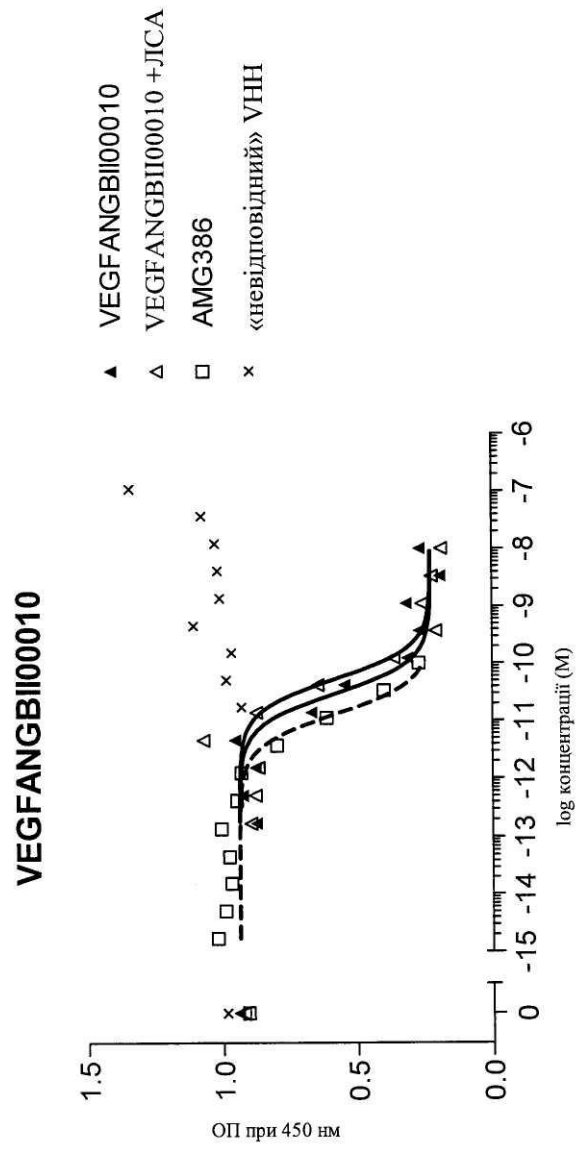
Фиг. 28-1В



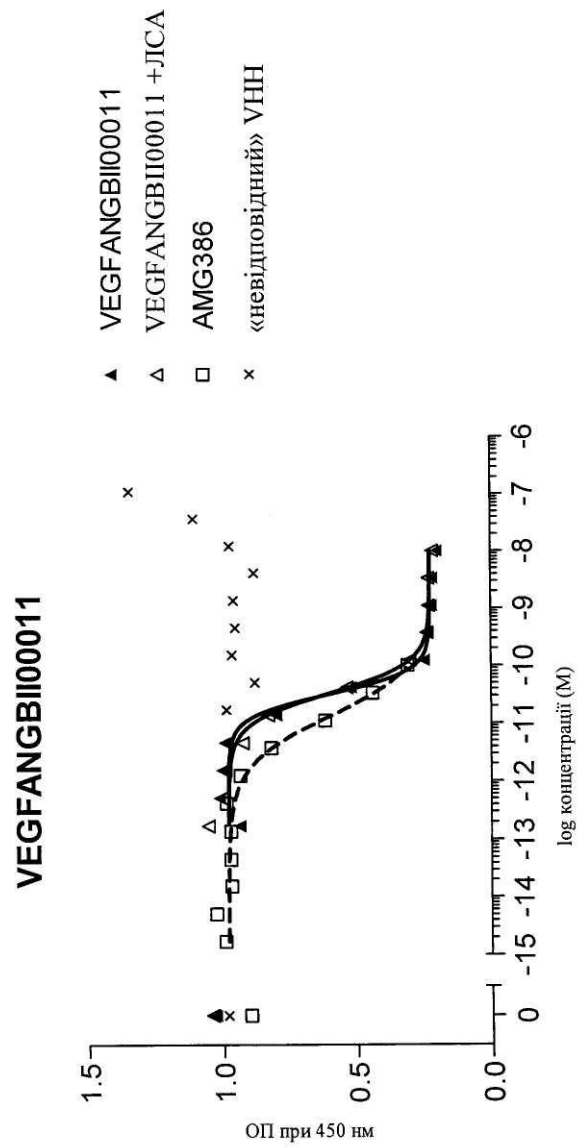
Фиг. 28-1Г



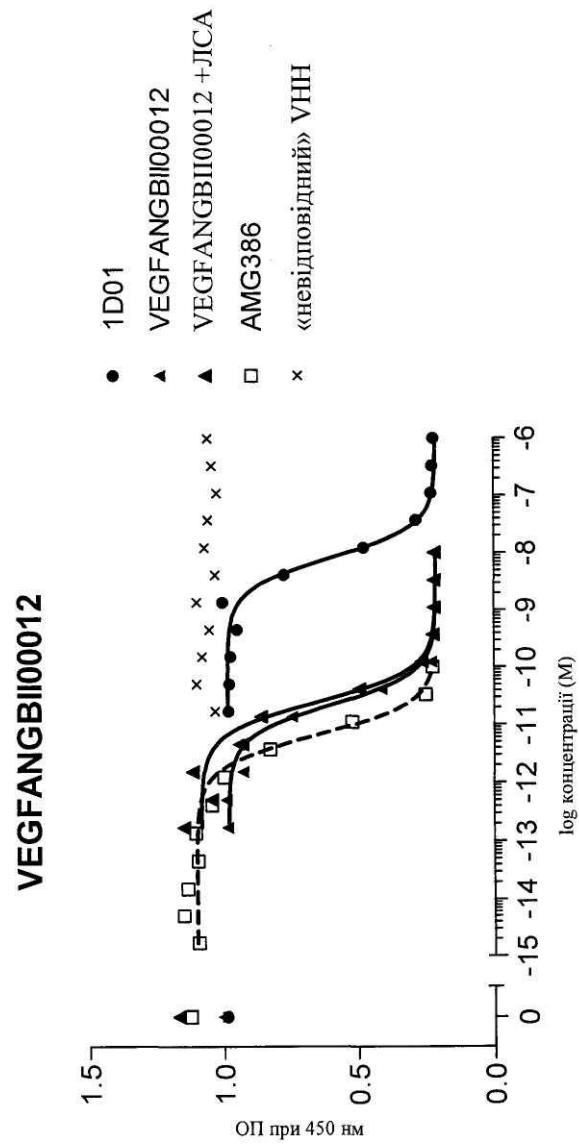
Фиг. 28-1Д



Фиг. 28-1Е



Фіг. 28-1Ж



Фіг. 28-13

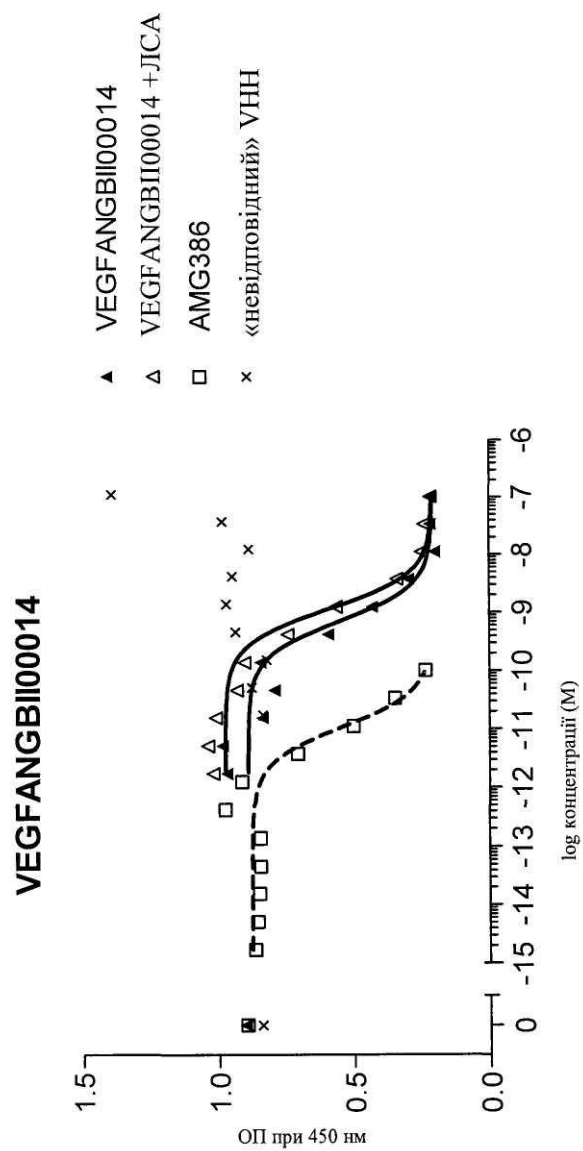
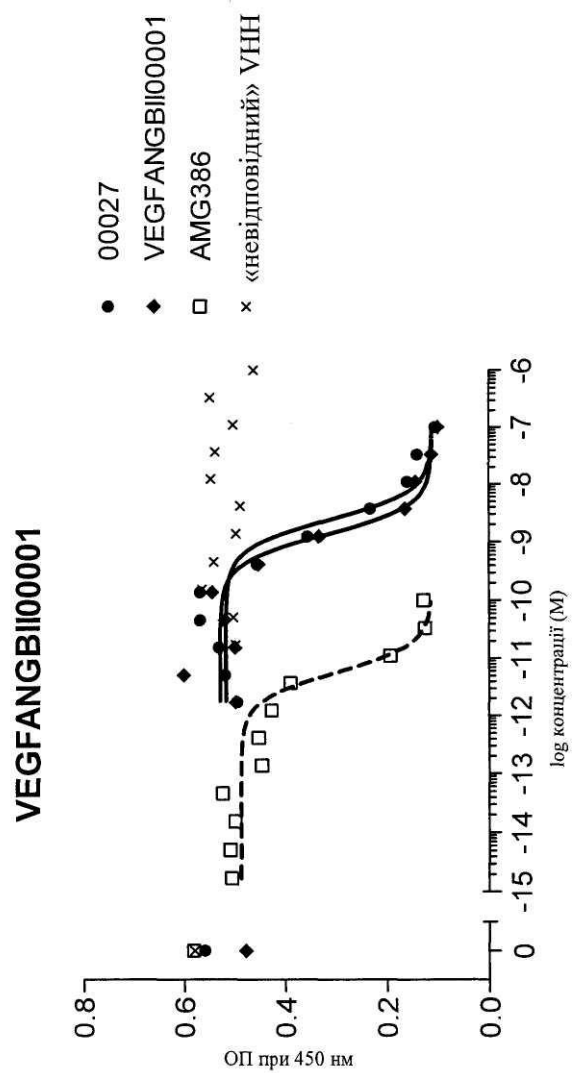
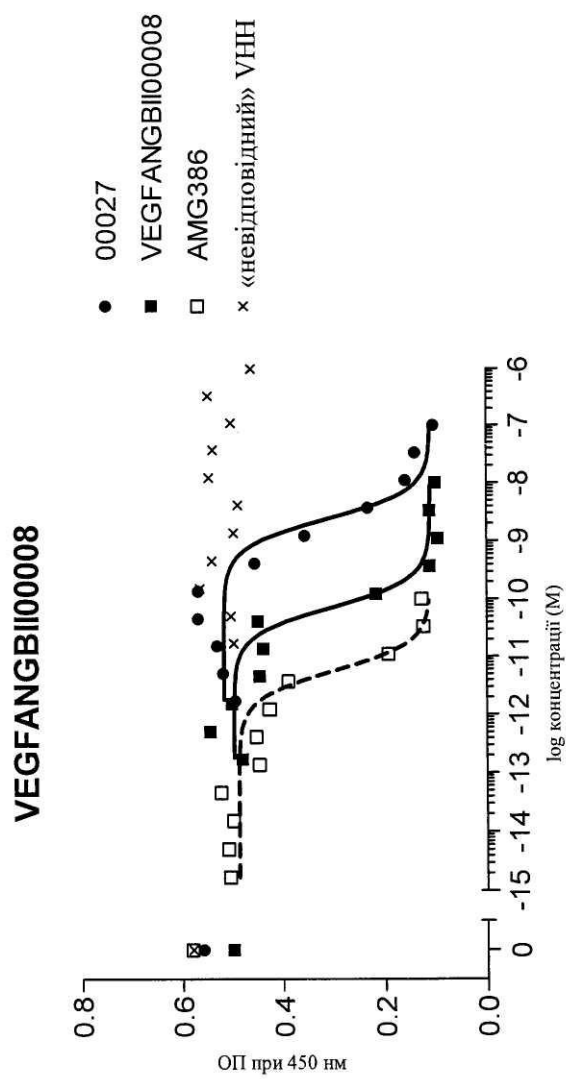


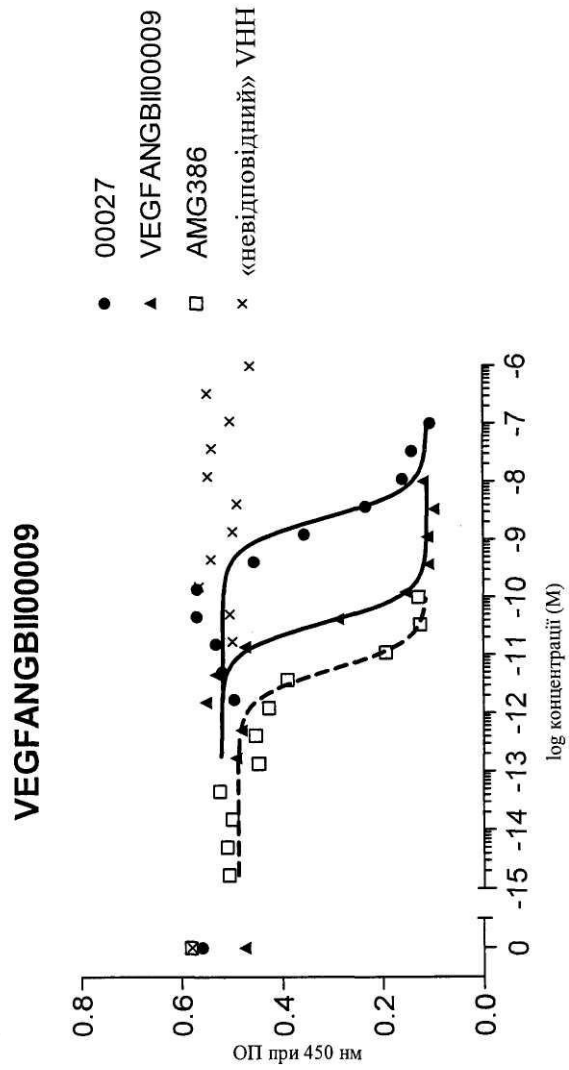
Fig. 28-2A



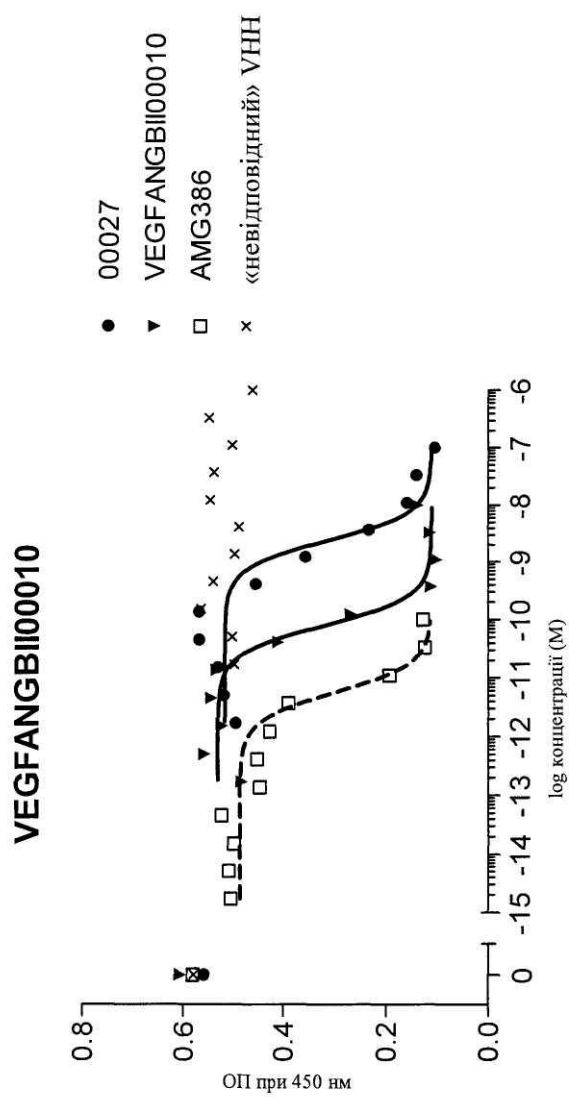
Фиг. 28-2Б



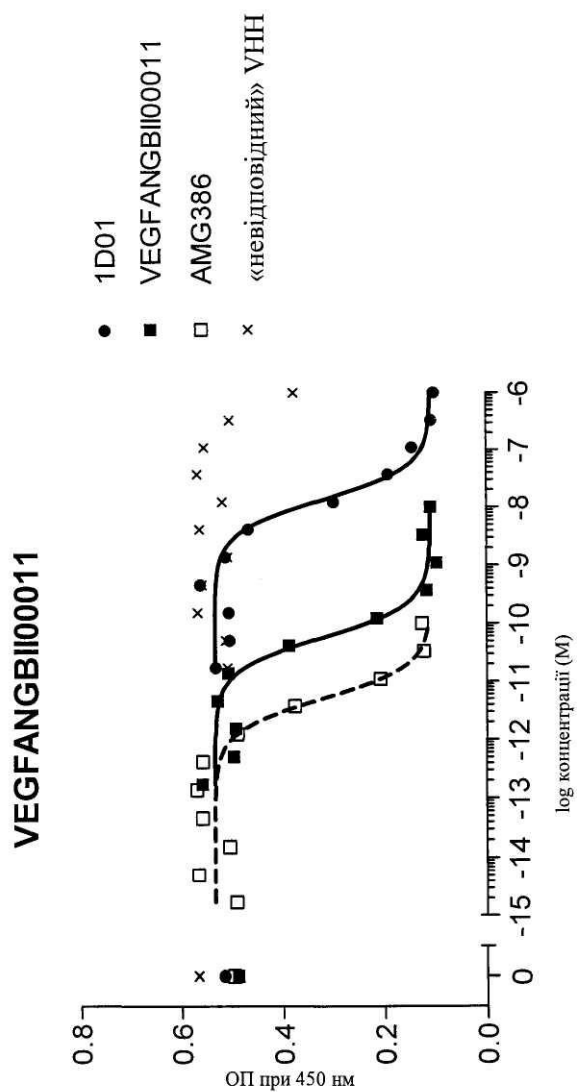
Фіг. 28-2В



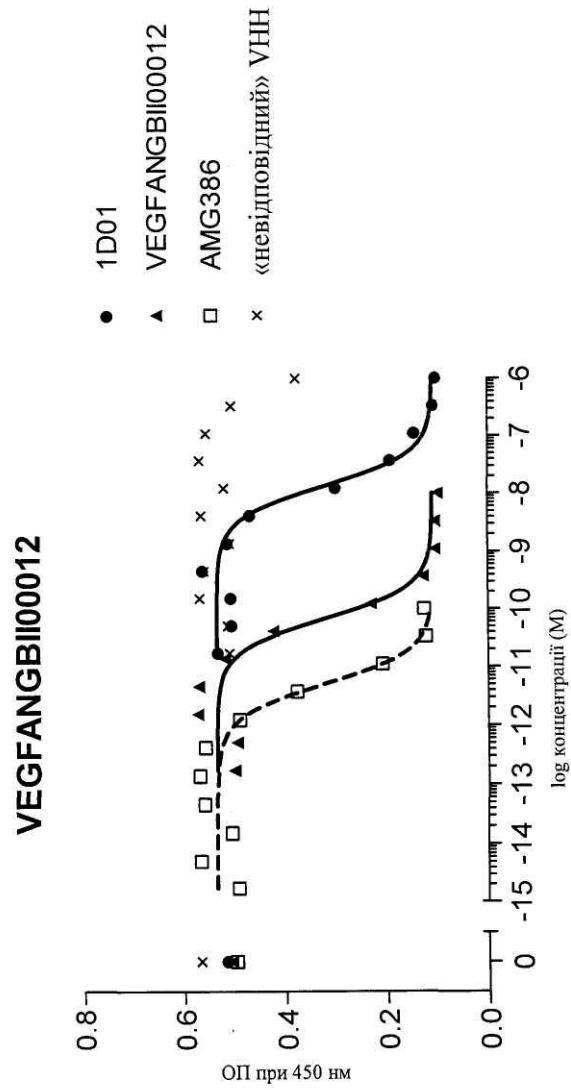
Фиг. 28-2Г



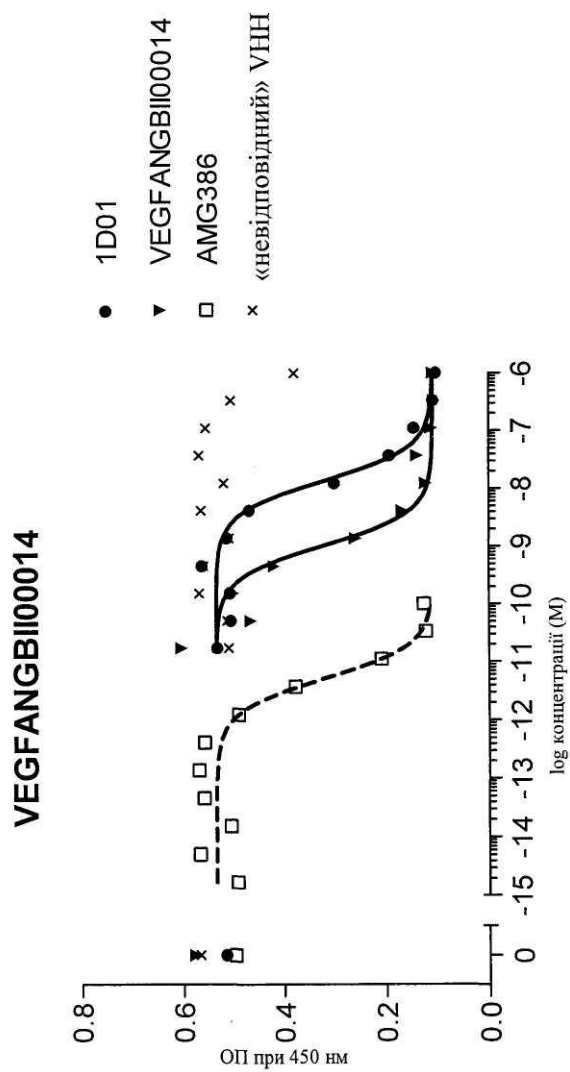
Фіг. 28-2Д



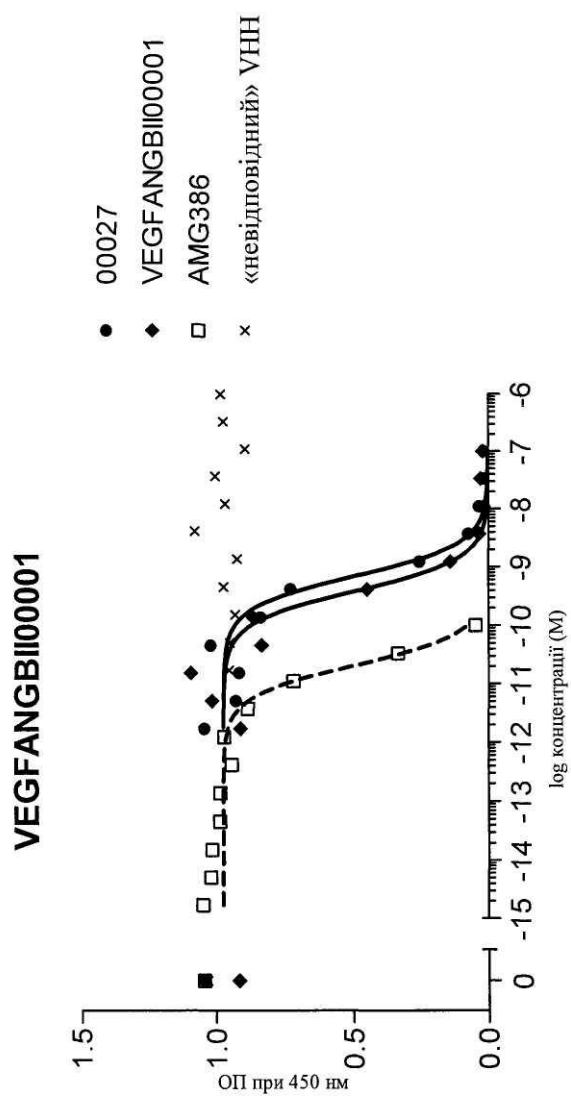
Фиг. 28-2Е



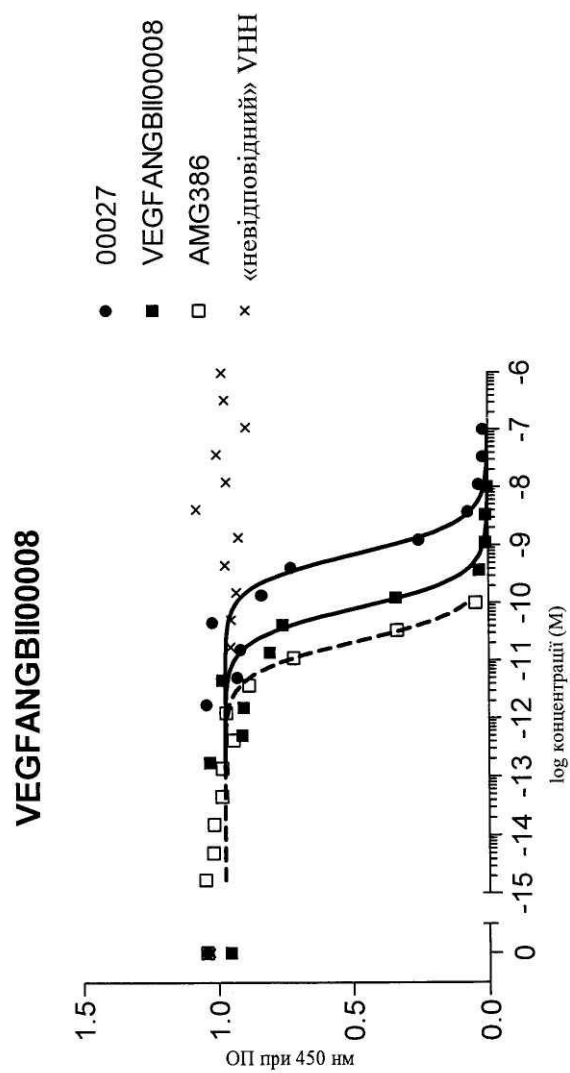
Фиг. 28-2Ж



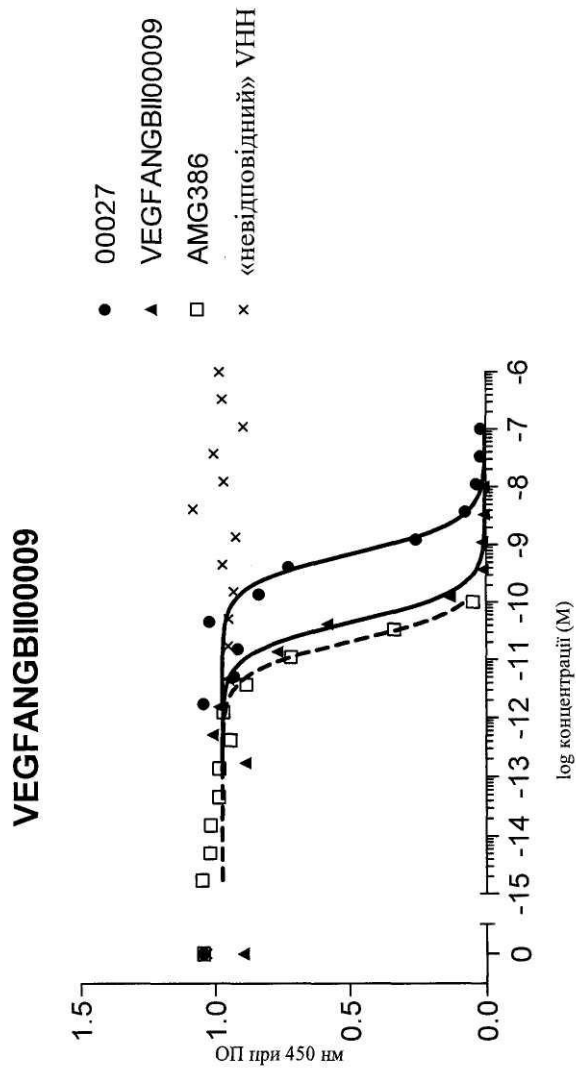
Фіг. 28-3А



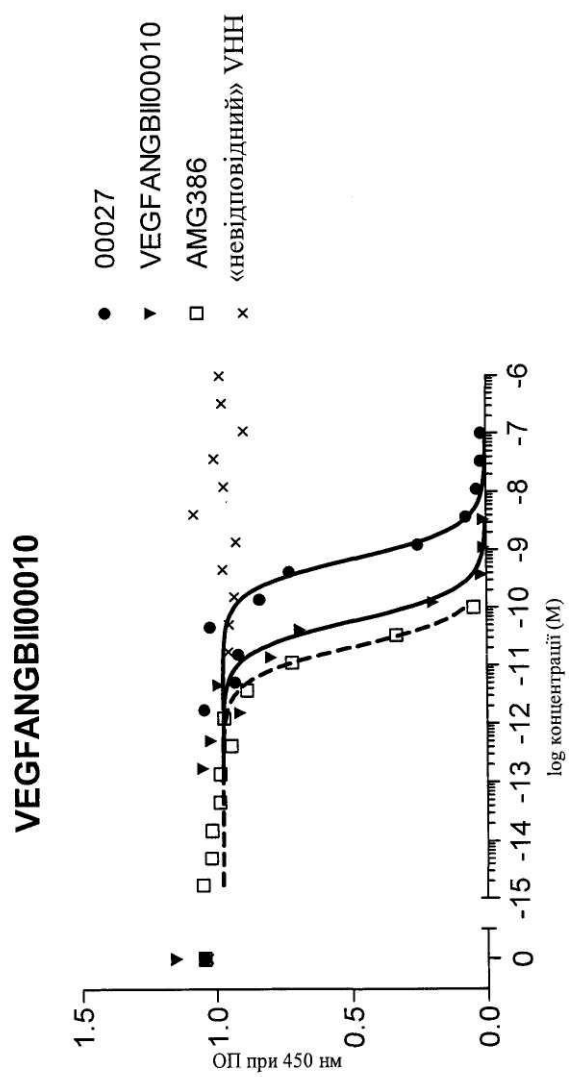
Фиг. 28-3Б



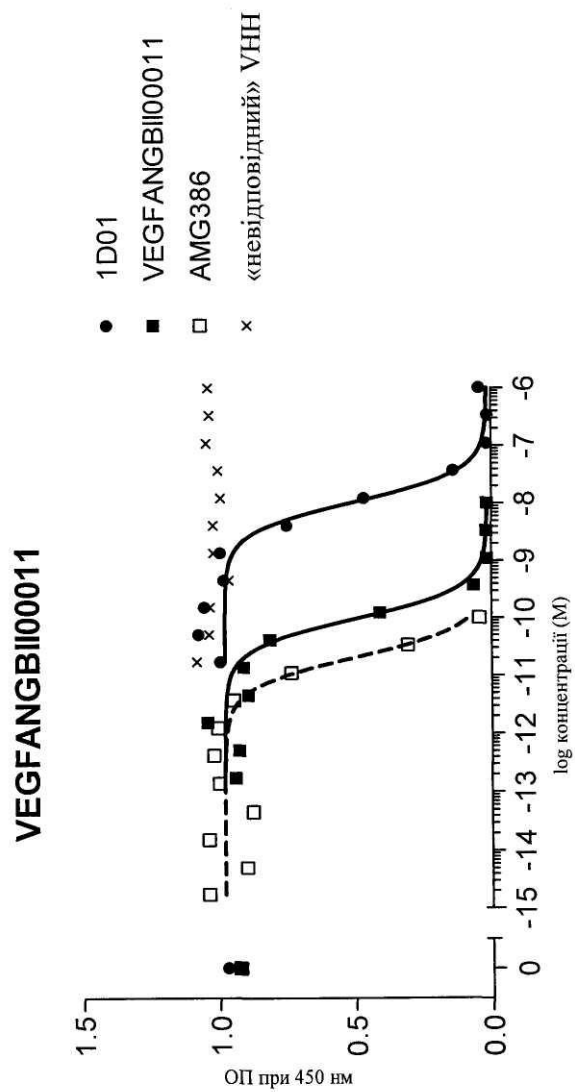
Фіг. 28-3В



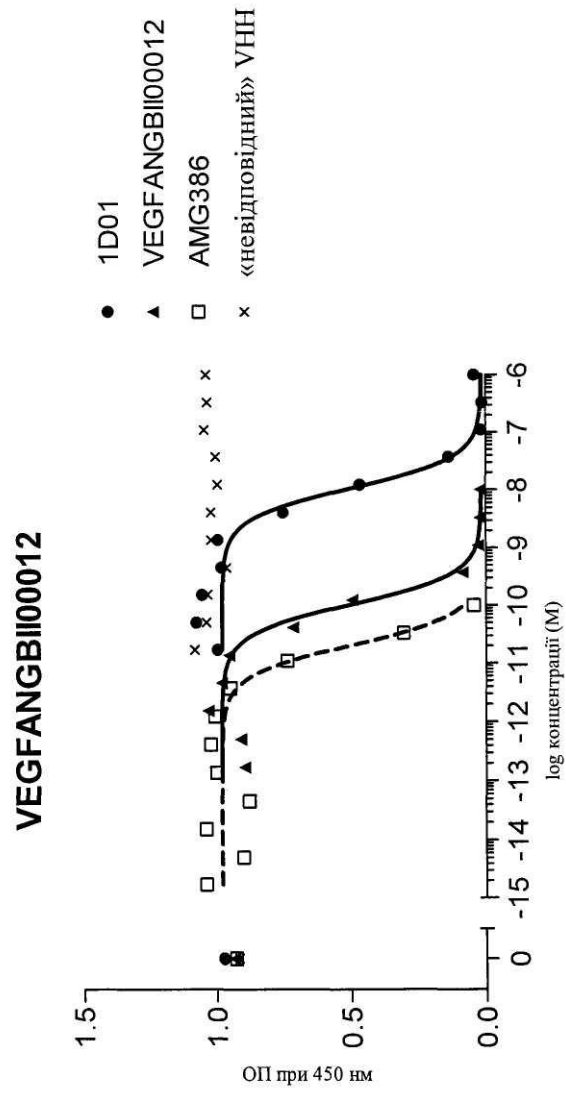
Фіг. 28-3Г



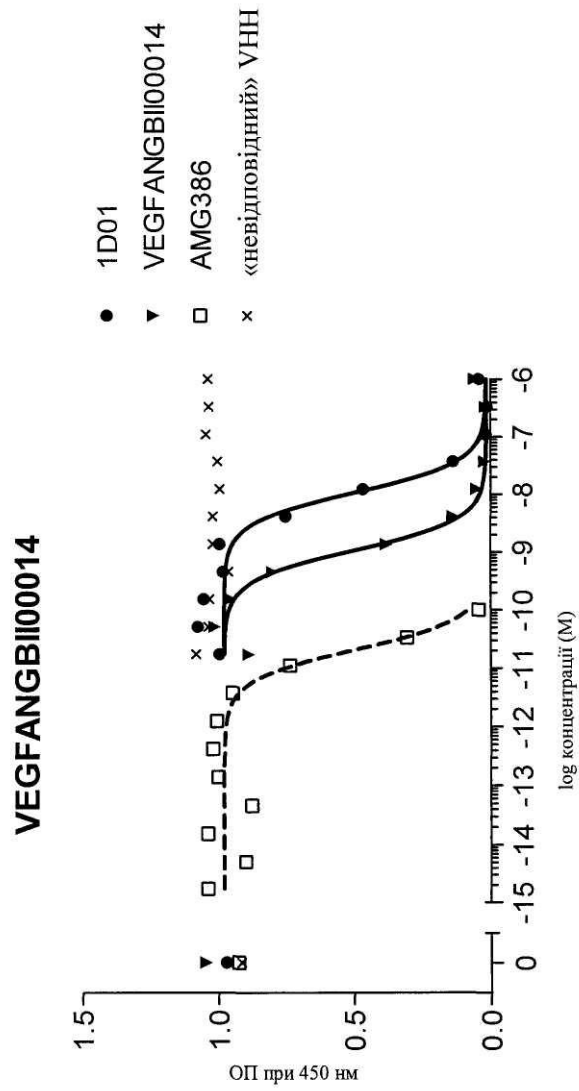
Фіг. 28-3Д



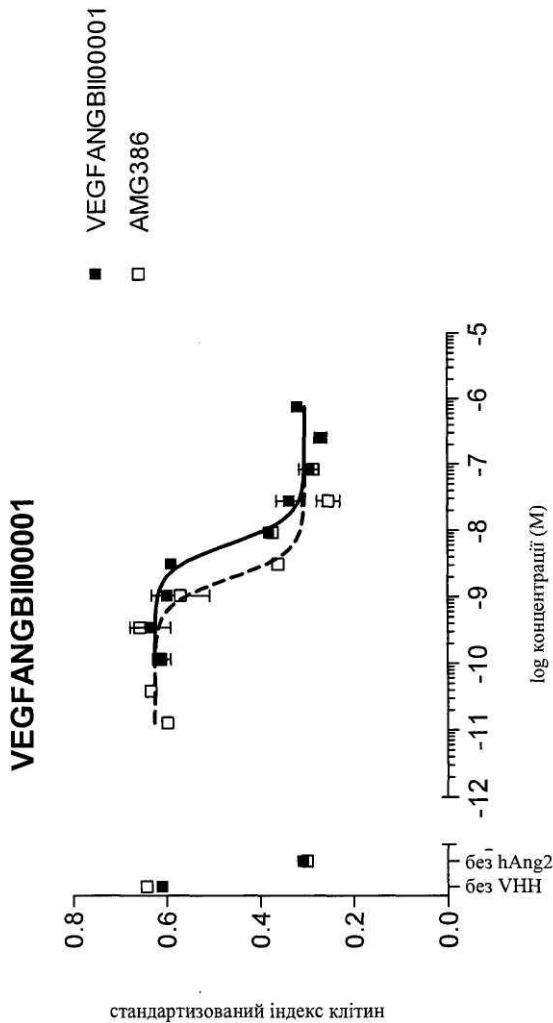
Фиг. 28-3Е



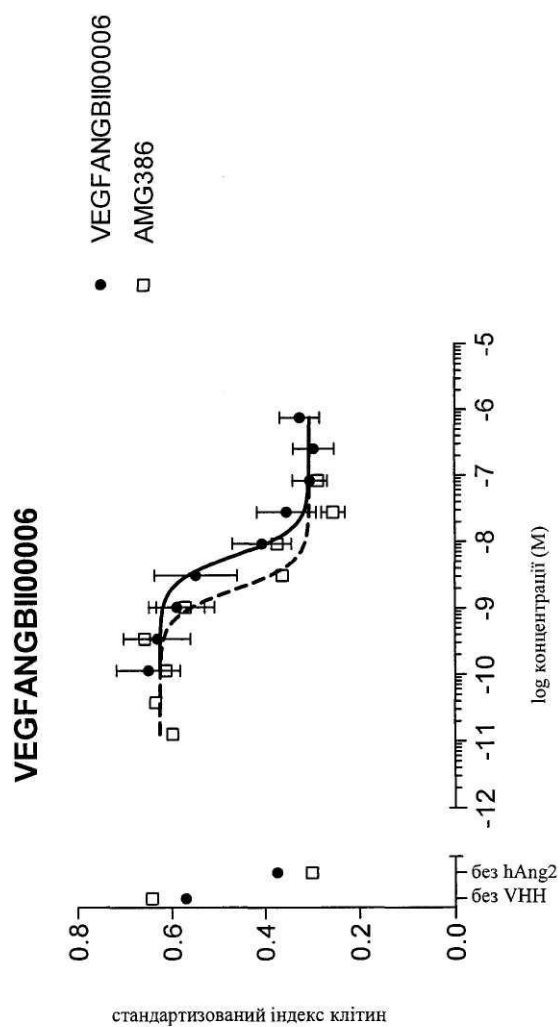
Фіг. 28-3Ж



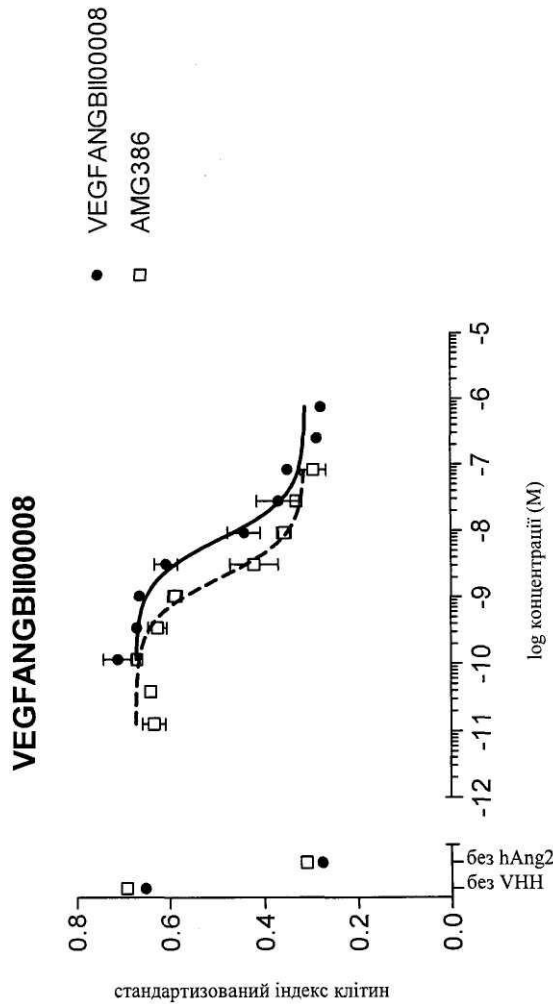
Фиг. 29А



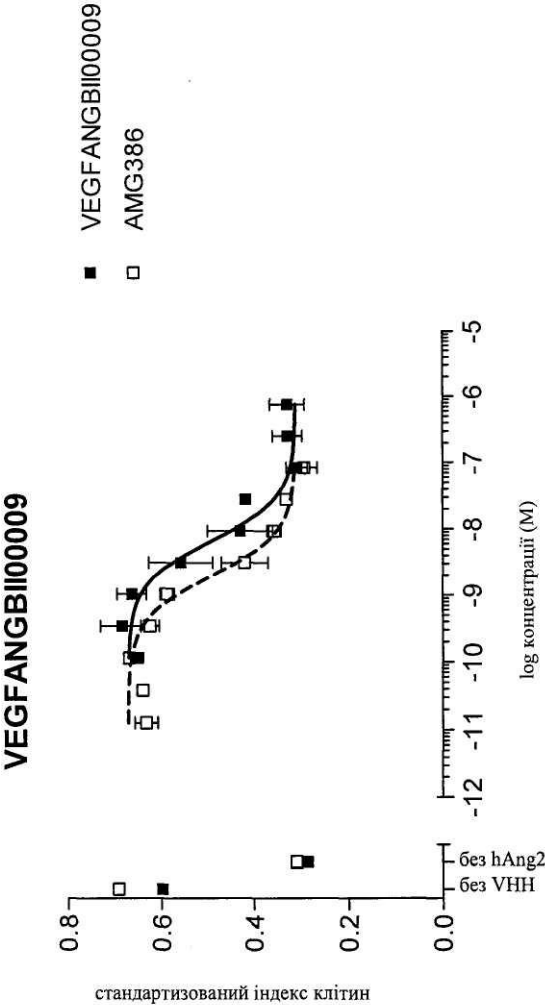
Фиг. 29Б



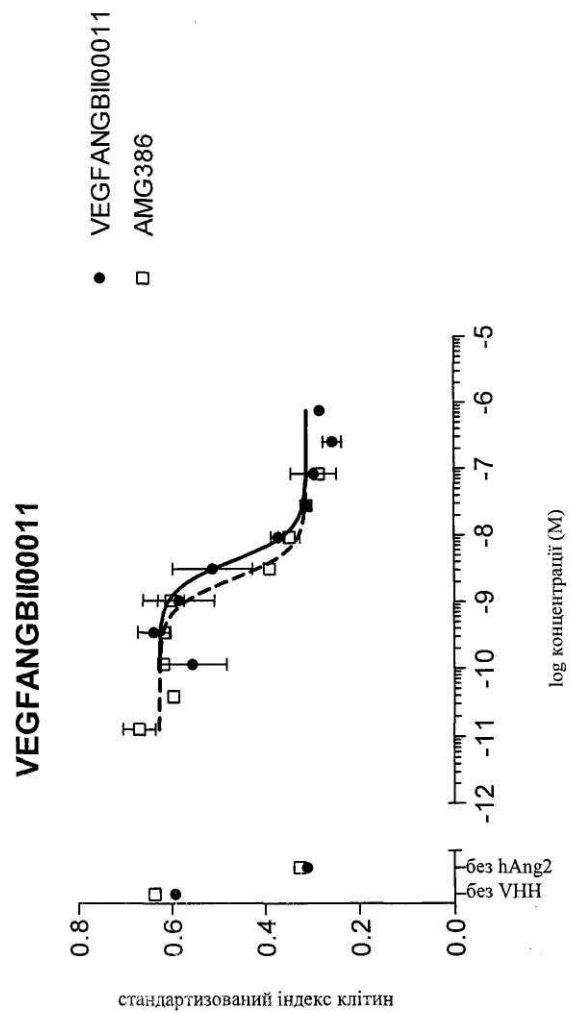
Фиг. 29В



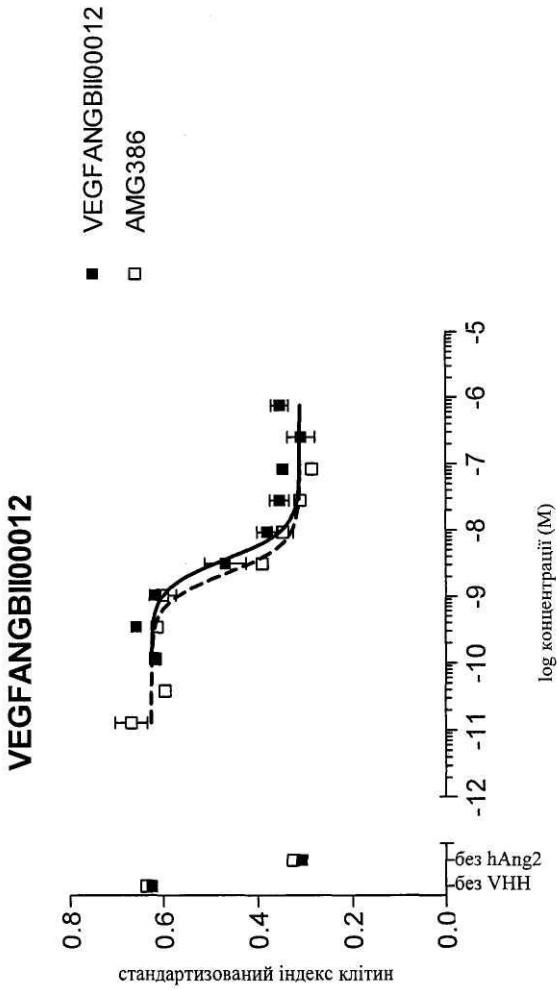
$\Phi_{ir, 29\Gamma}$








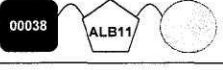


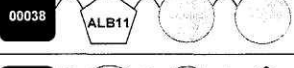
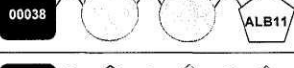
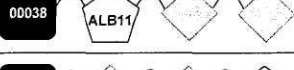

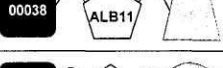
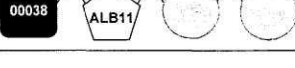
Фиг. 29Д



Фиг. 29Е


















Фиг. 30

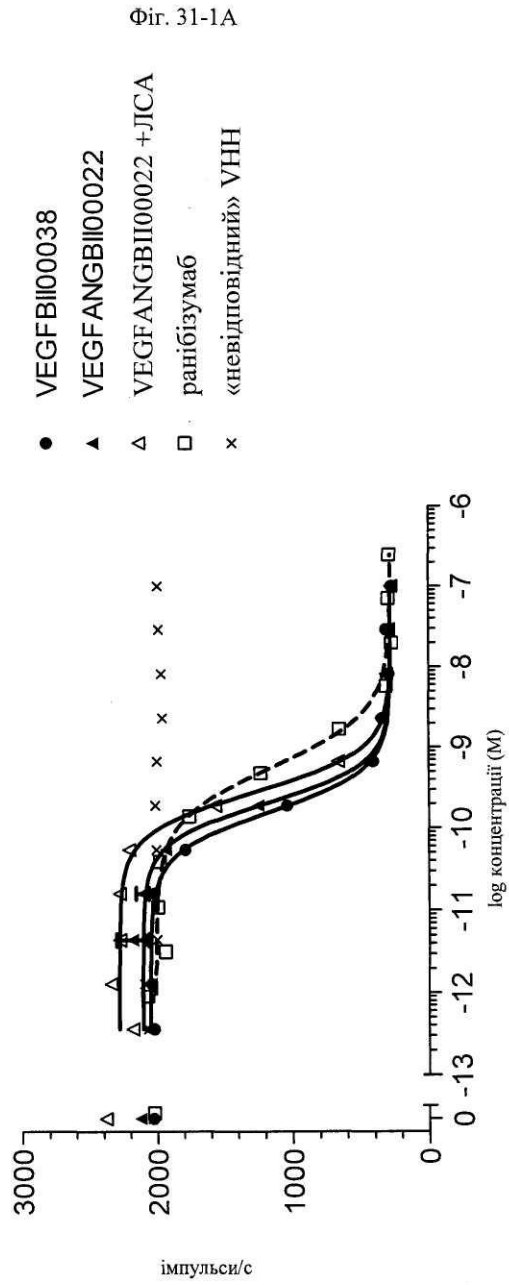
VHH ID	Формат	Опис
VEGFANGBII00015		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00908
VEGFANGBII00016		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00932
VEGFANGBII00017		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00933
VEGFANGBII00018		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00934
VEGFANGBII00019		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00935
VEGFANGBII00020		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00936
VEGFANGBII00021		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00937
VEGFANGBII00022		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00938
VEGFANGBII00023		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00919-9gs-00919
VEGFANGBII00024		VEGFBII00038-9gs-00919-9gs-00919-9gs-ALB11
VEGFANGBII00025		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00921-9gs-00921
VEGFANGBII00026		VEGFBII00038-9gs-00921-9gs-00921-9gs-ALB11
VEGFANGBII00027		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00928
VEGFANGBII00028		VEGFBII00038-9gs-ALB11-9gs-00956-9gs-00956

Фіг. 30 (продовження)

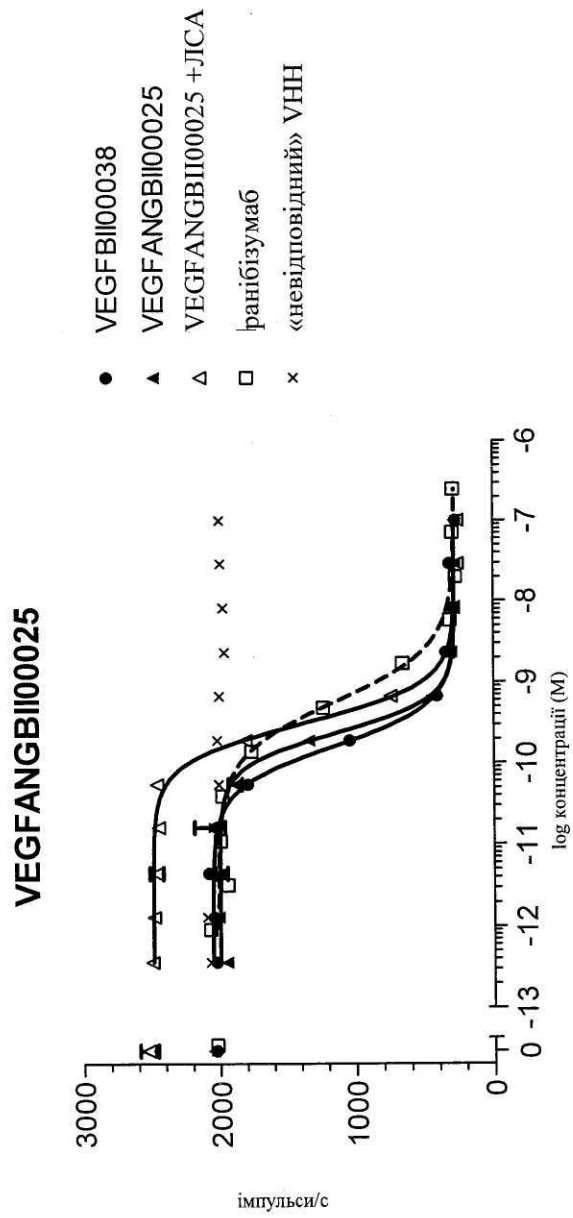
Позначення:

	Опис		Опис
	VEGFBII00038		00937
	00908		00938
	00919		00956
	00932		00921
	00933		00928
	00934		ALB11
	00935		лінкер 9 GlySer
	00936		

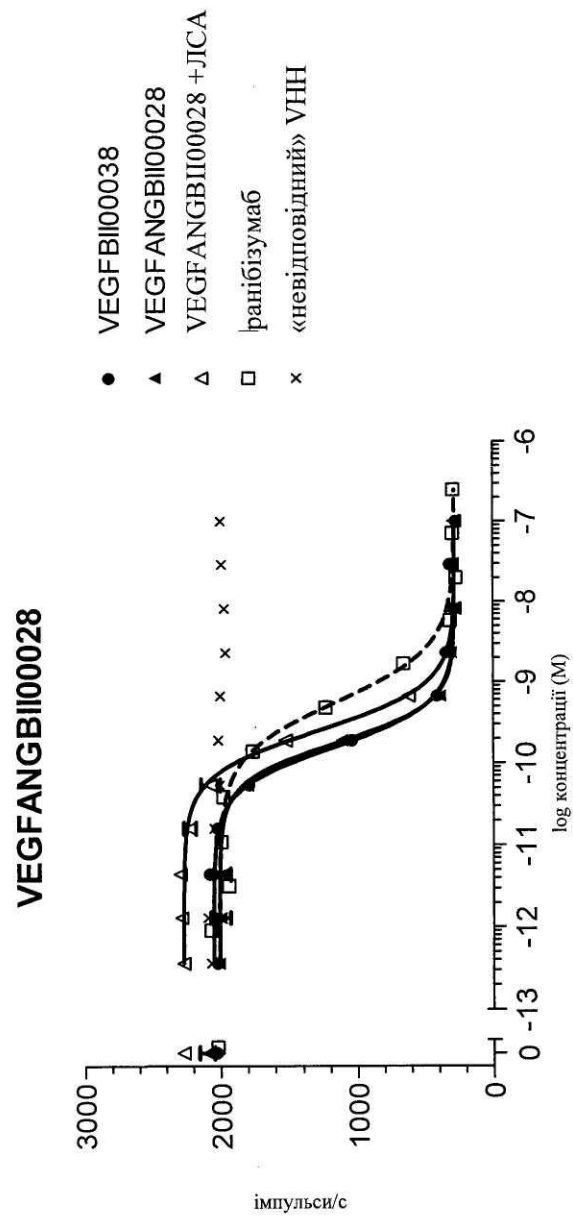
VEGFANGBI00022

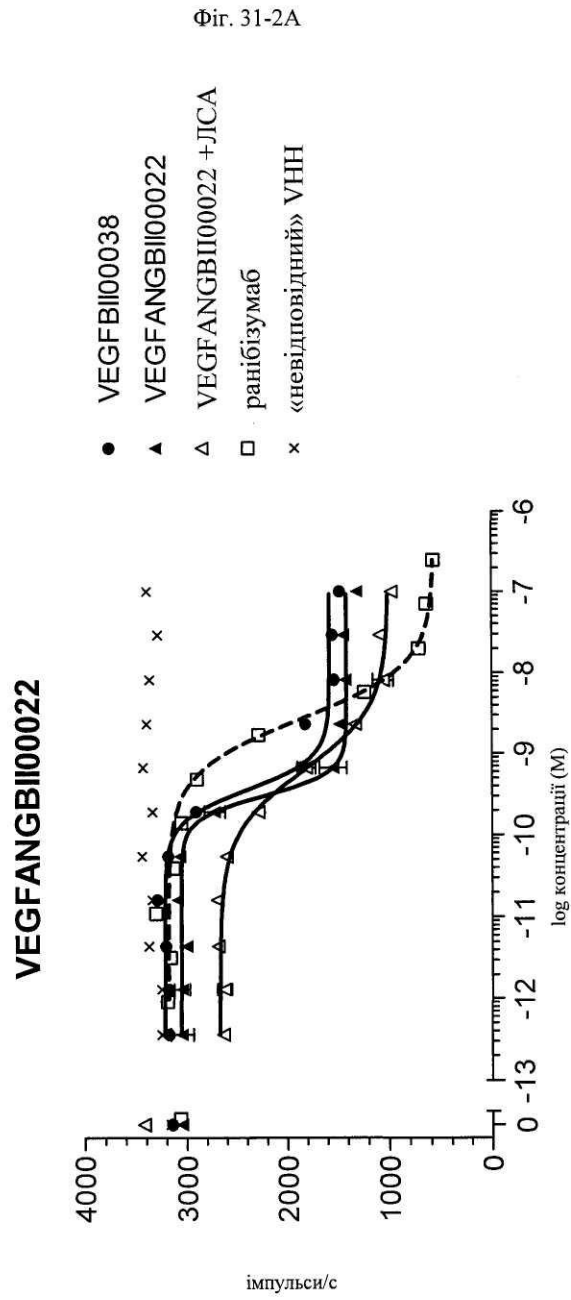


Фиг. 31-1Б

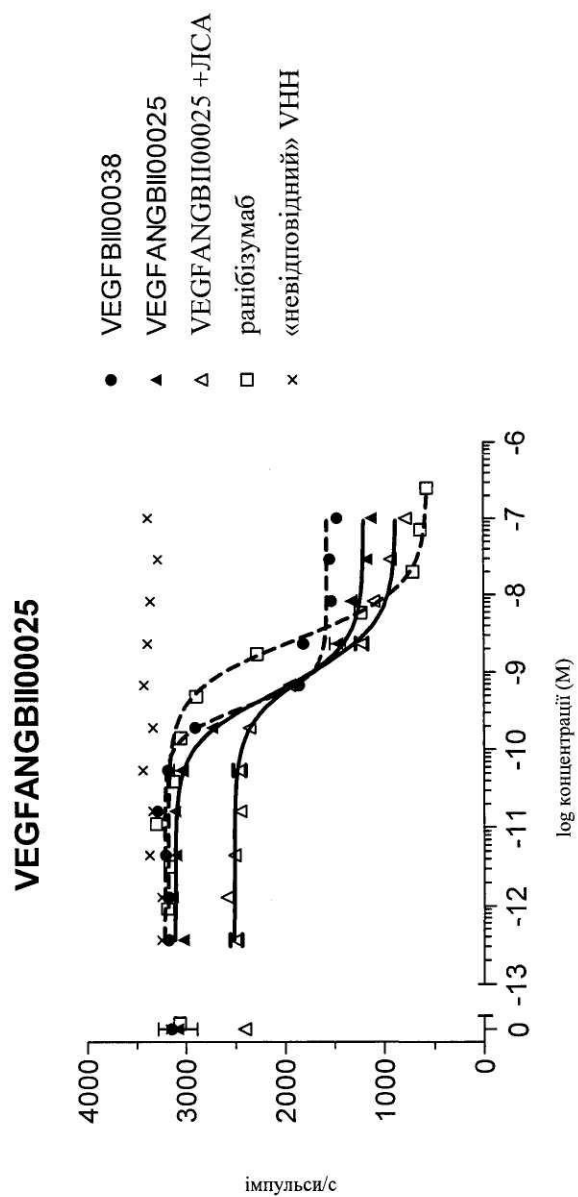


Фіг. 31-1В

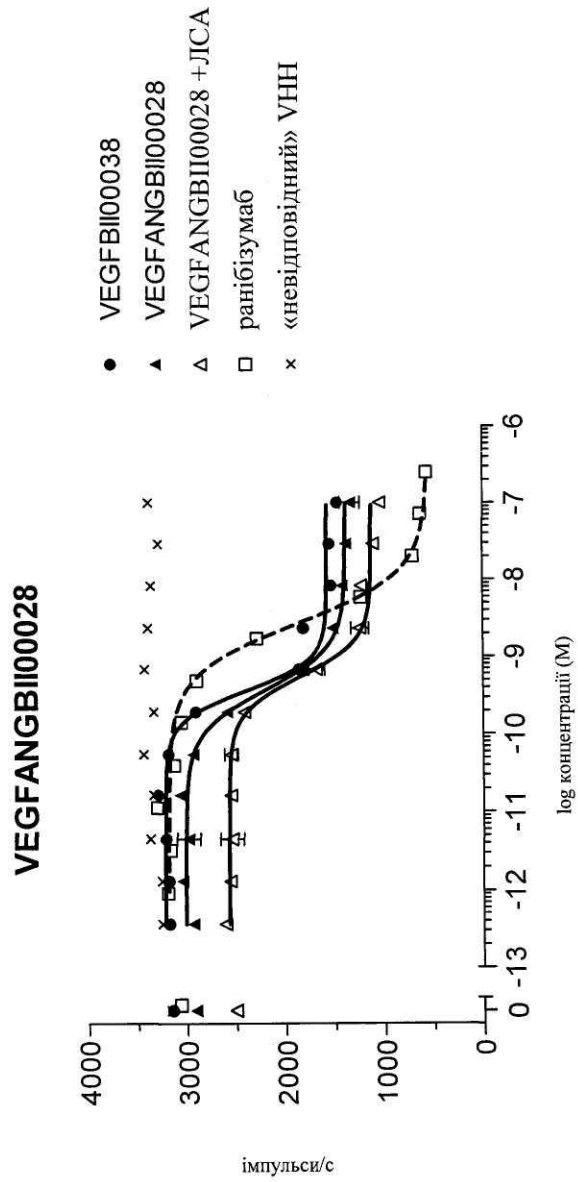




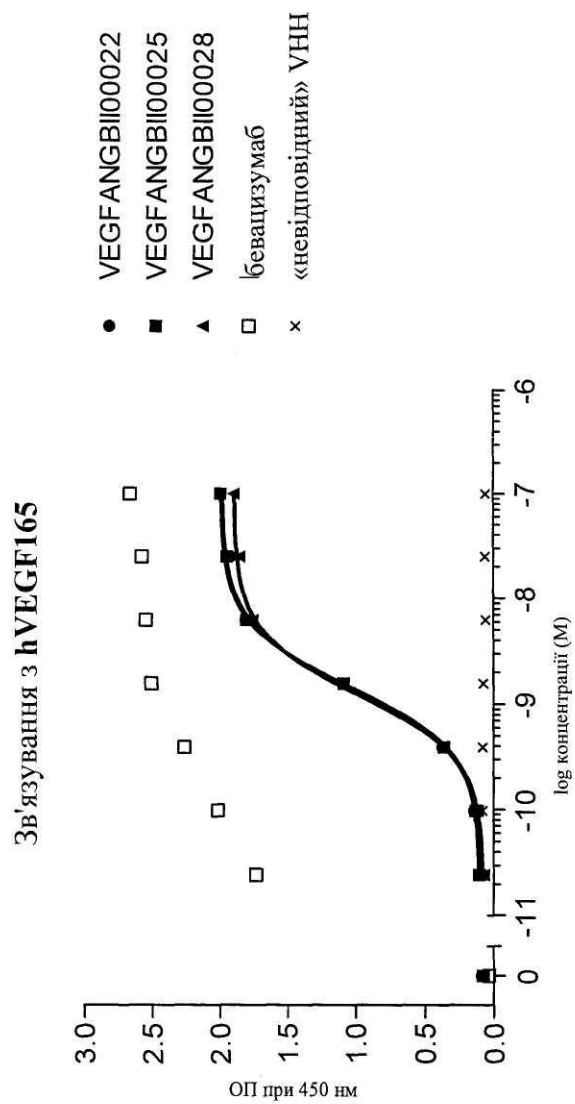
Фіг. 31-2Б



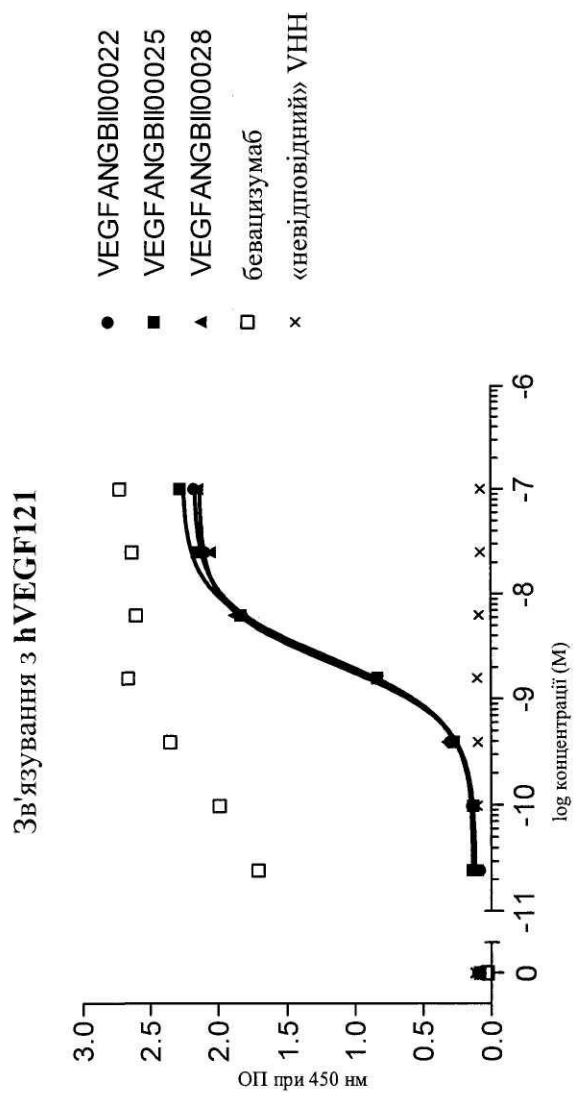
Фіг. 31-2В



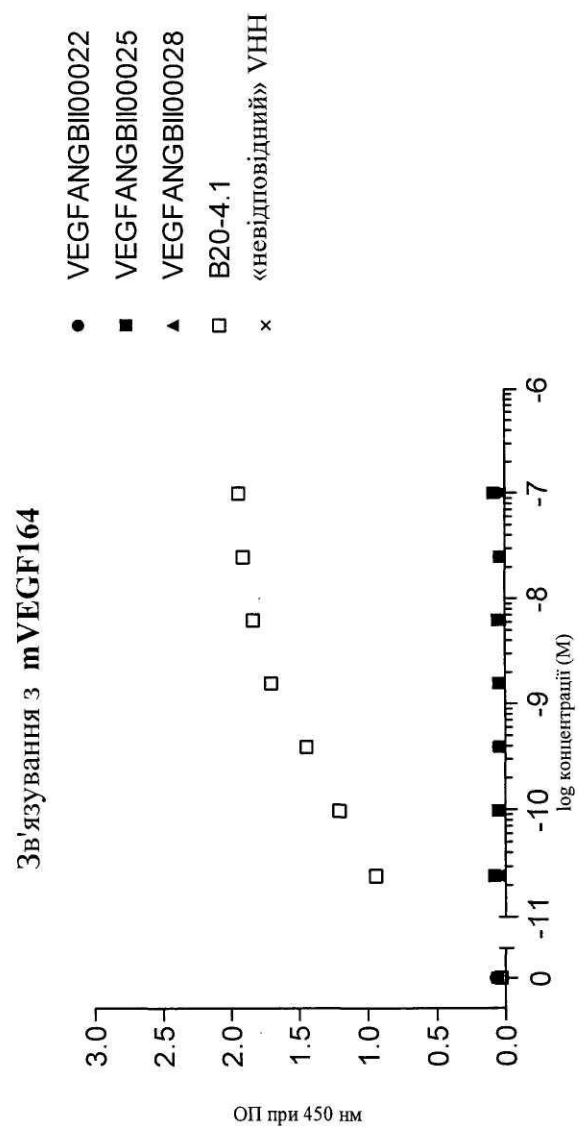
Фиг. 32А



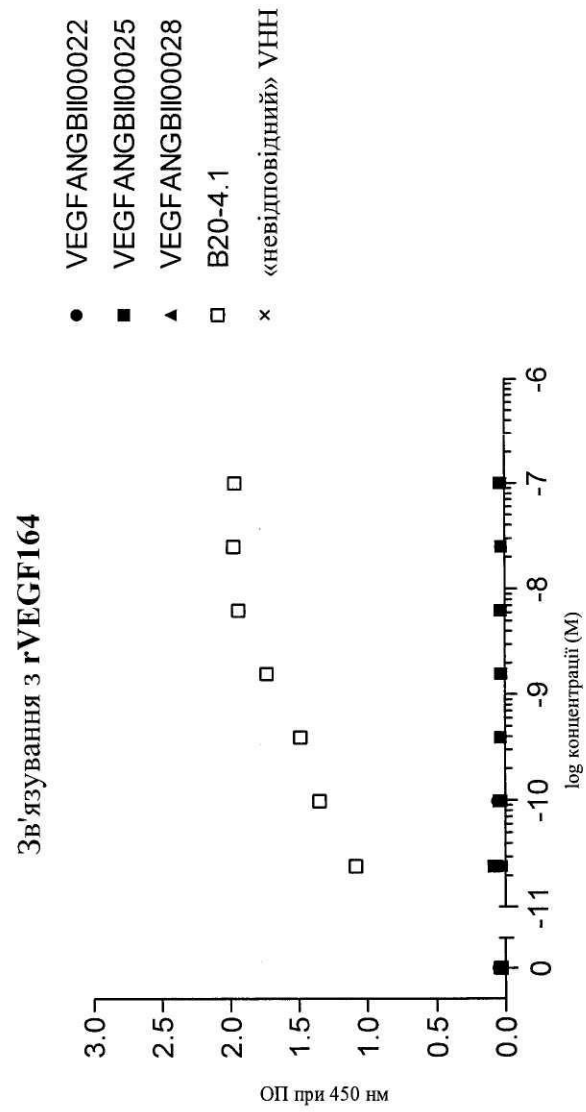
Фіг. 32Б



Фіг. 33А

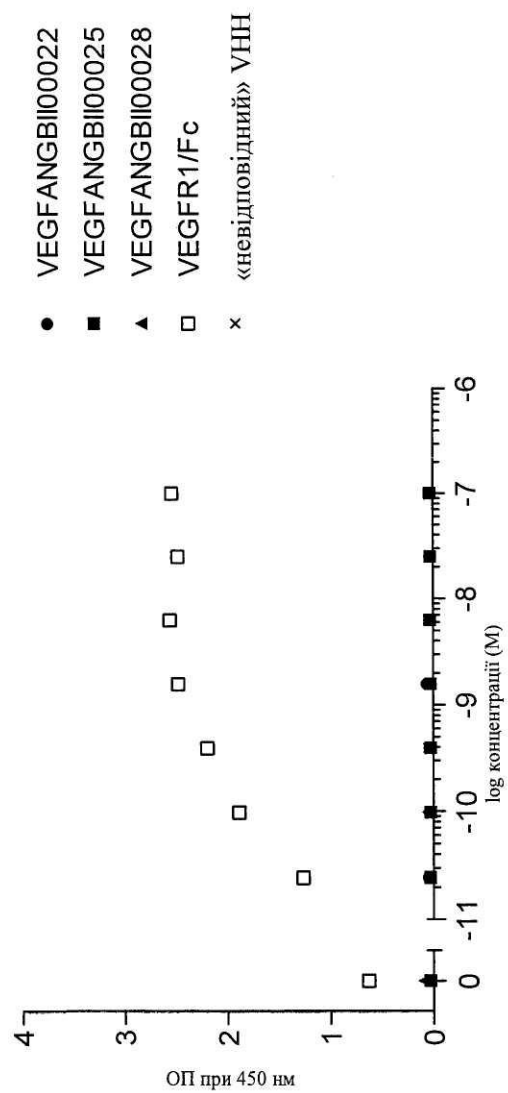


Фіг. 33Б



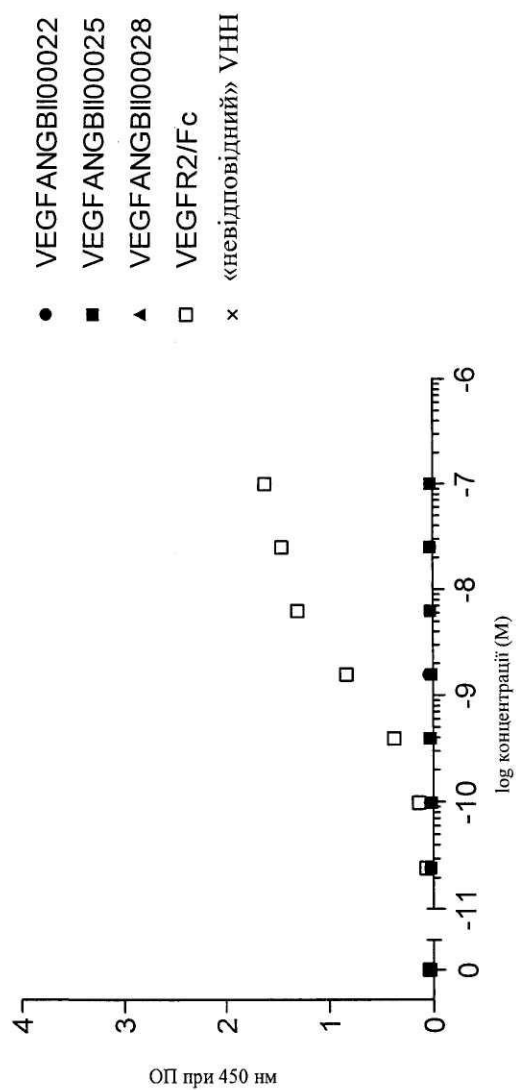
Фіг. 34А

Зв'язування з hVEGF-B

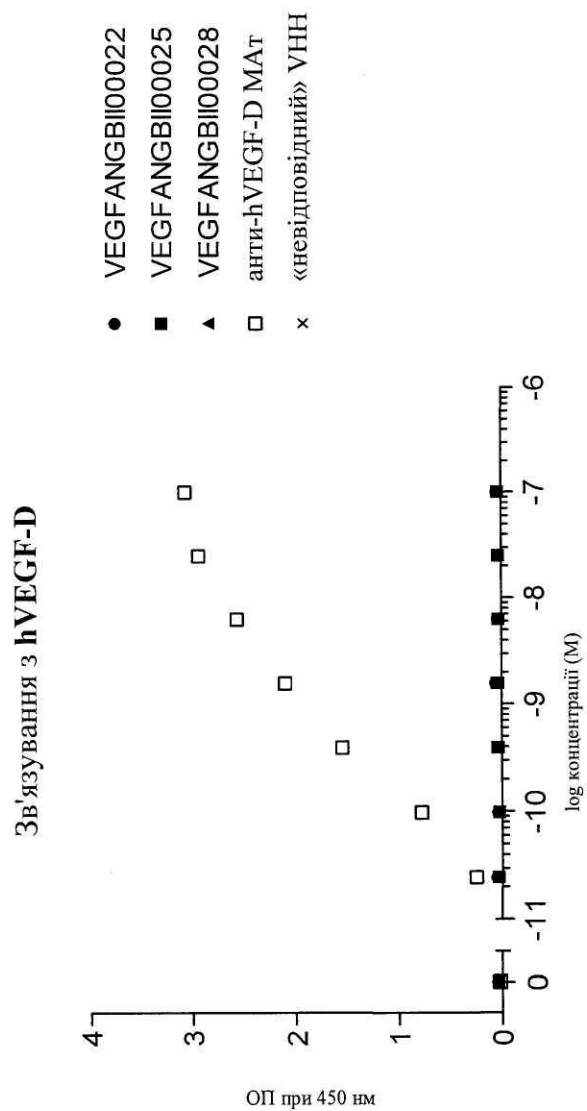


Фір. 34Б

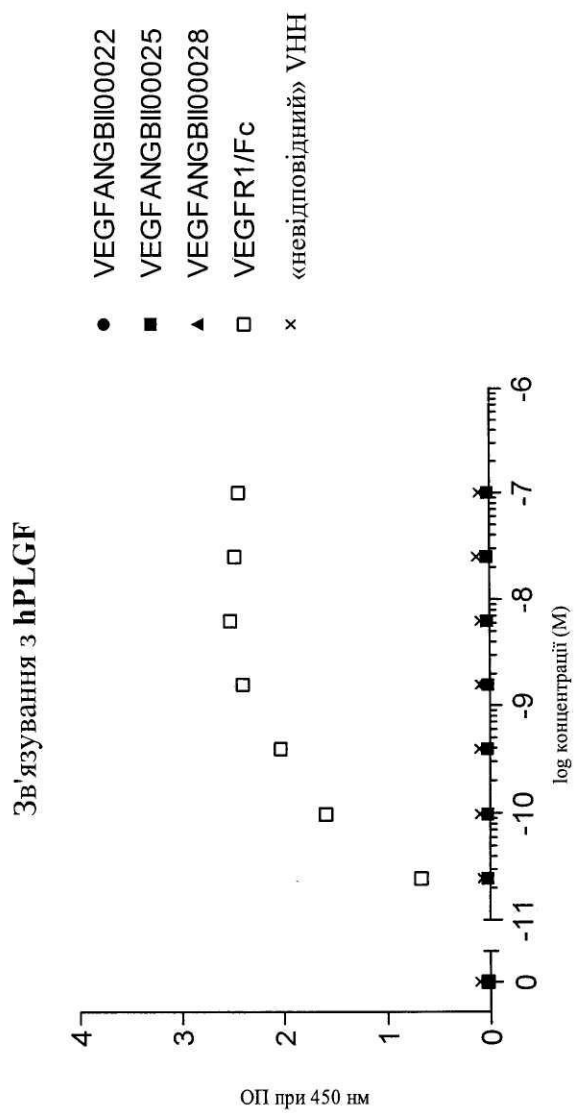
Зв'язування з hVEGF-C



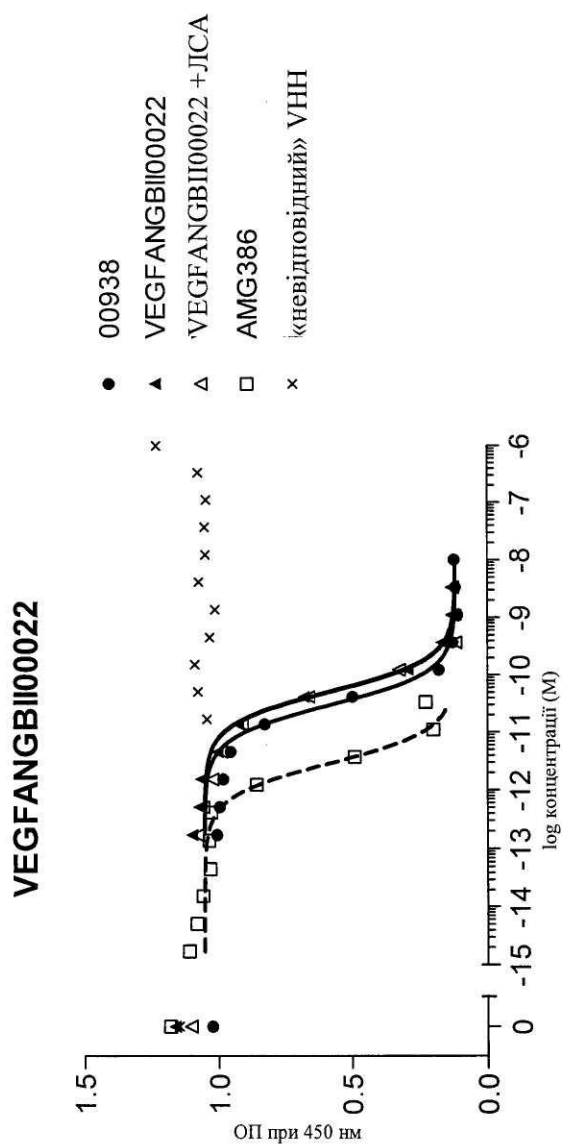
Фіг. 34В



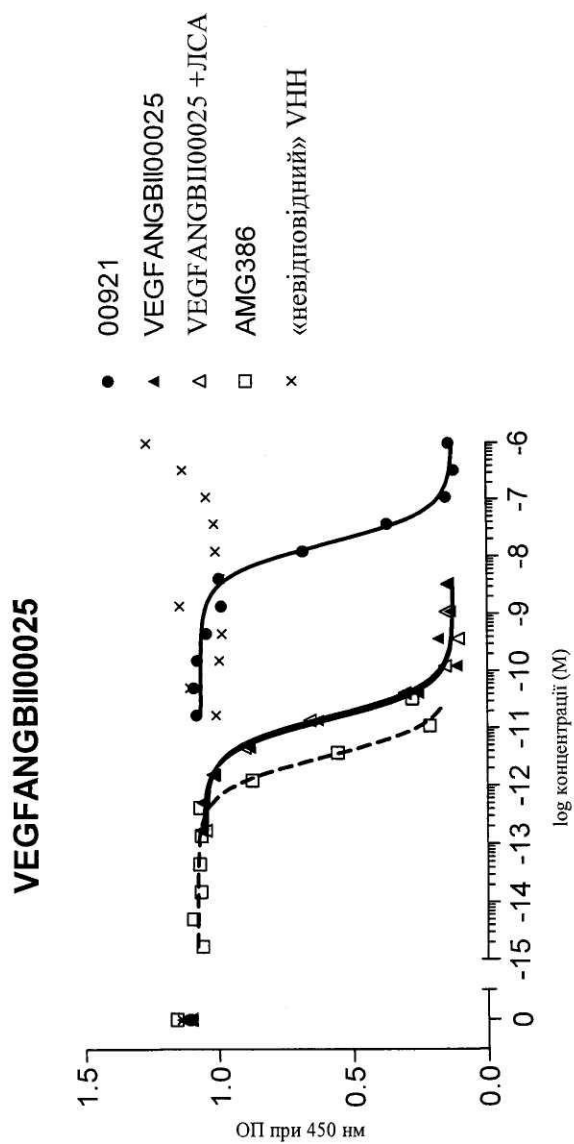
Фіг. 34Г



Фір. 35-1А

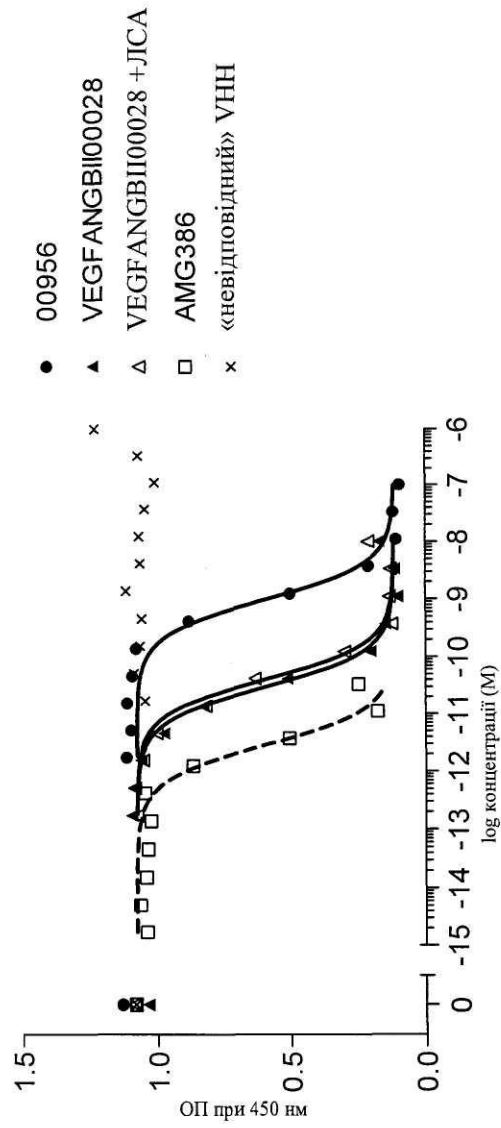


Фіг. 35-1Б

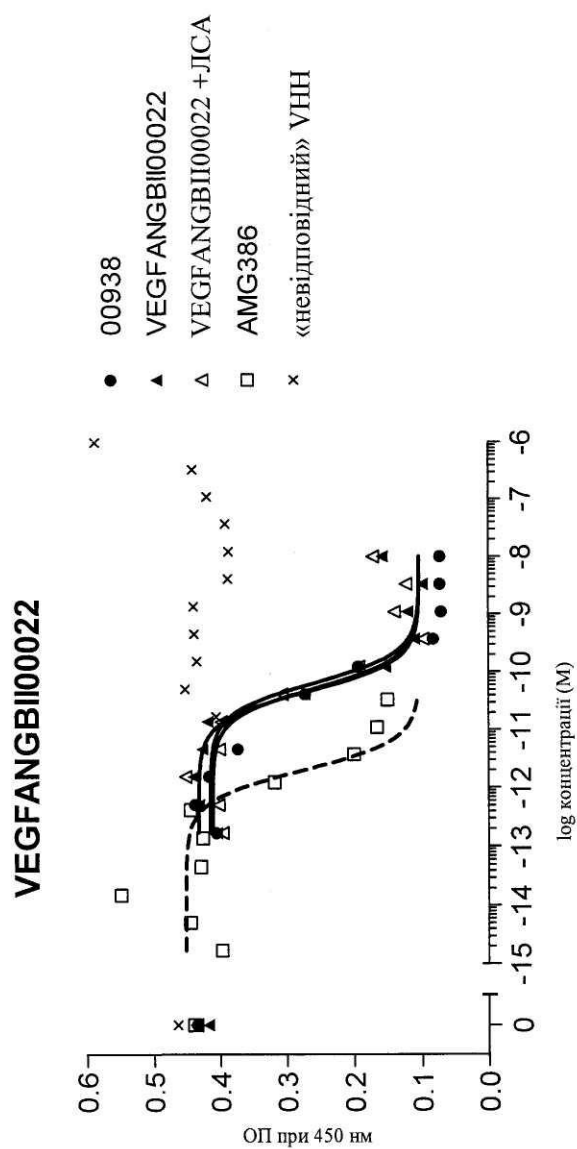


Фір. 35-1В

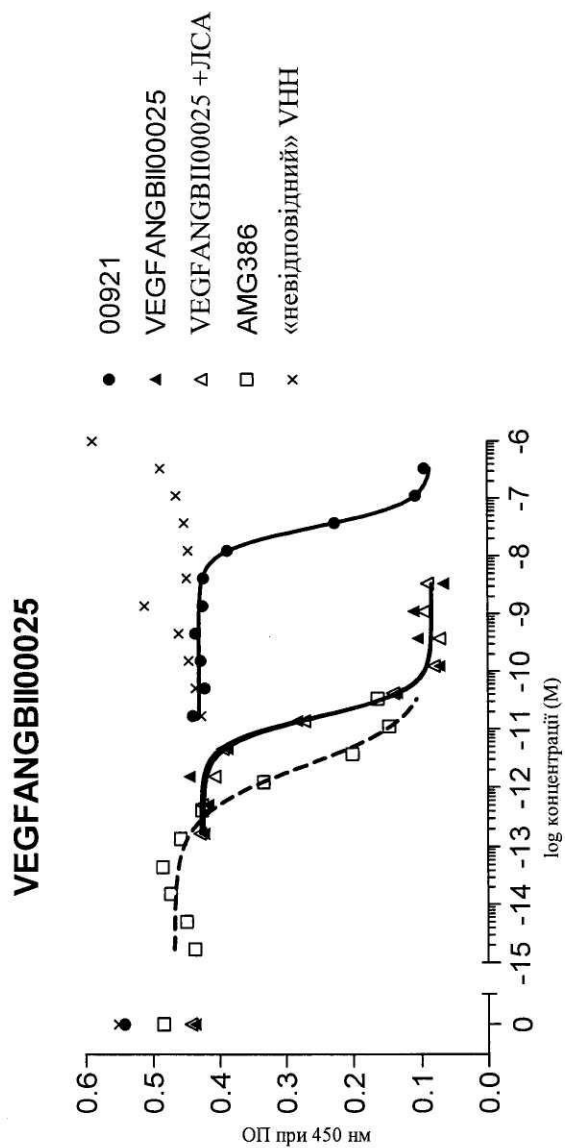
VEGFANGBI00028



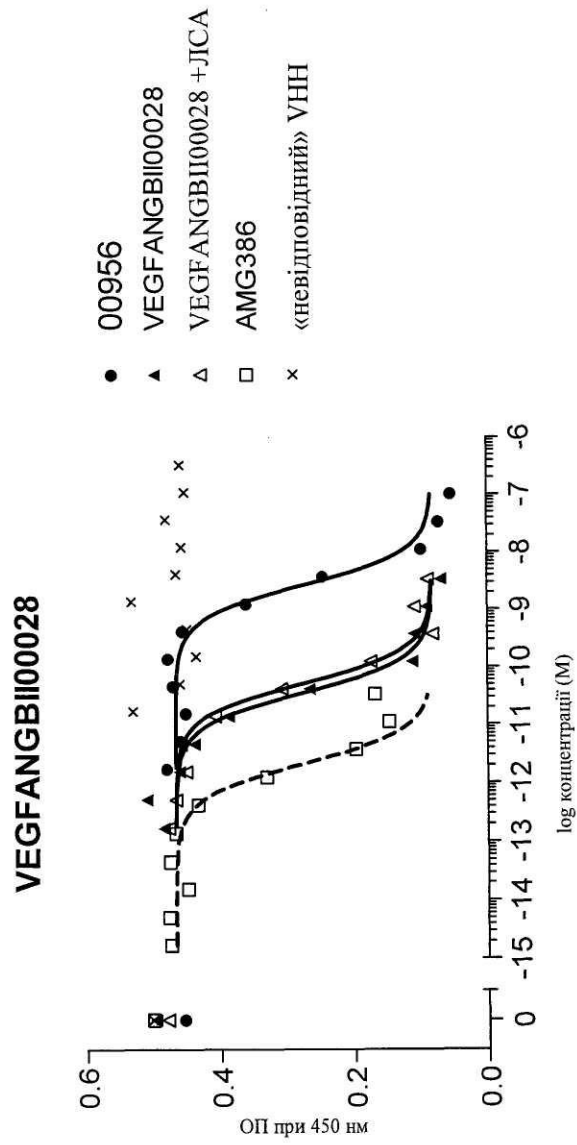
Фіг. 35-2А



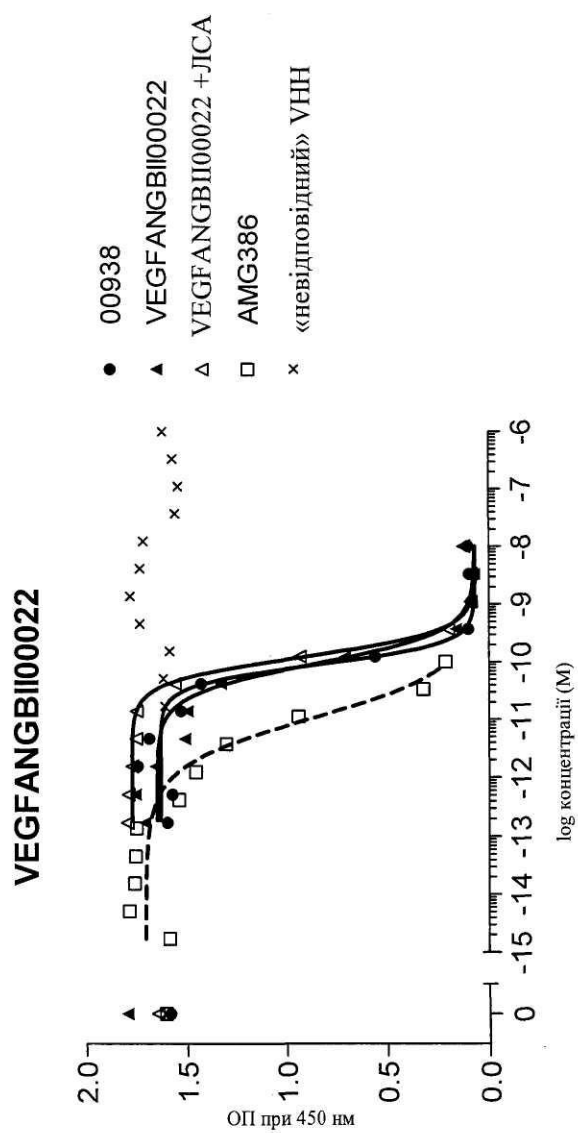
Фиг. 35-2Б



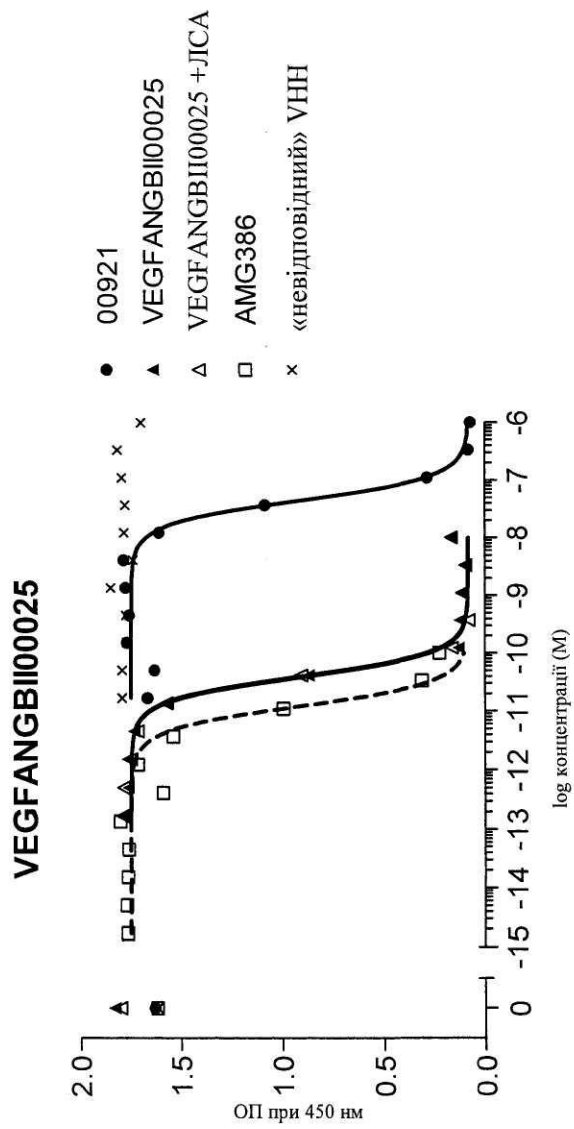
Фир. 35-2В



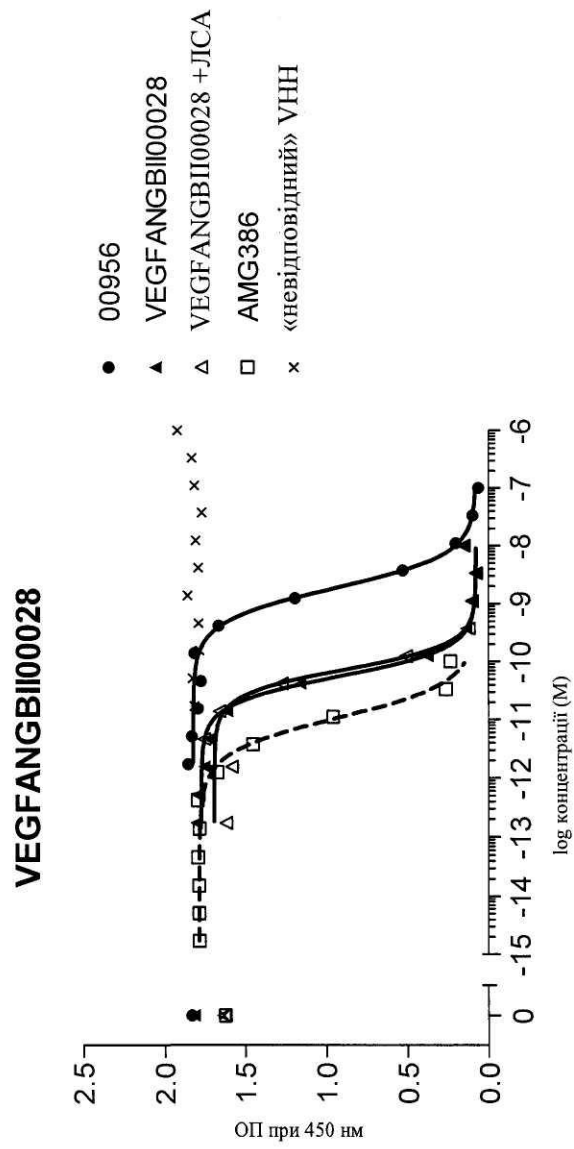
Фіг. 35-3А



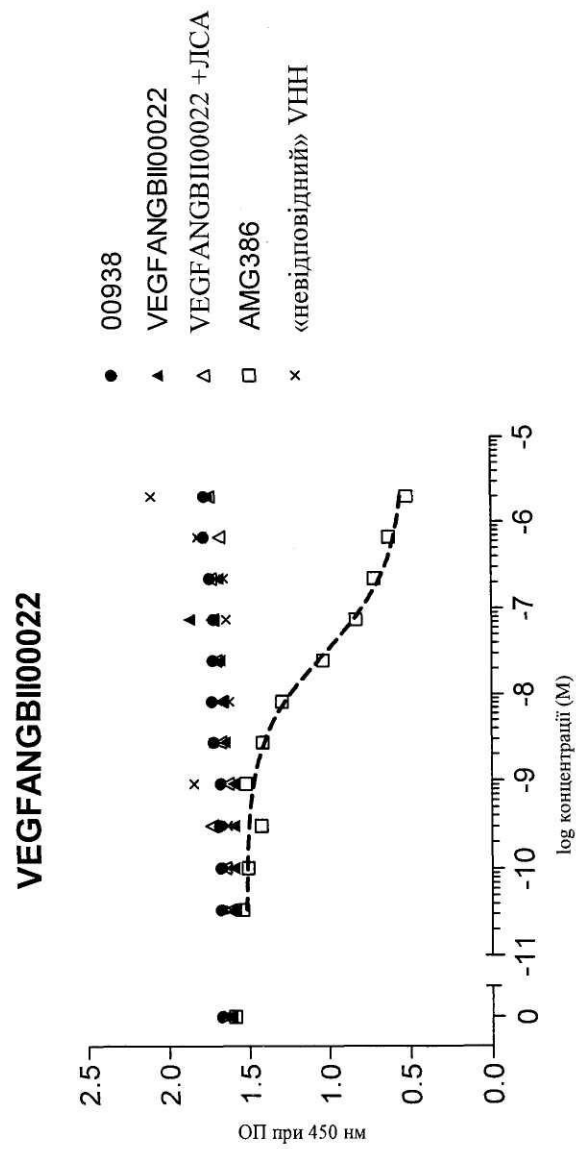
Фіг. 35-3Б



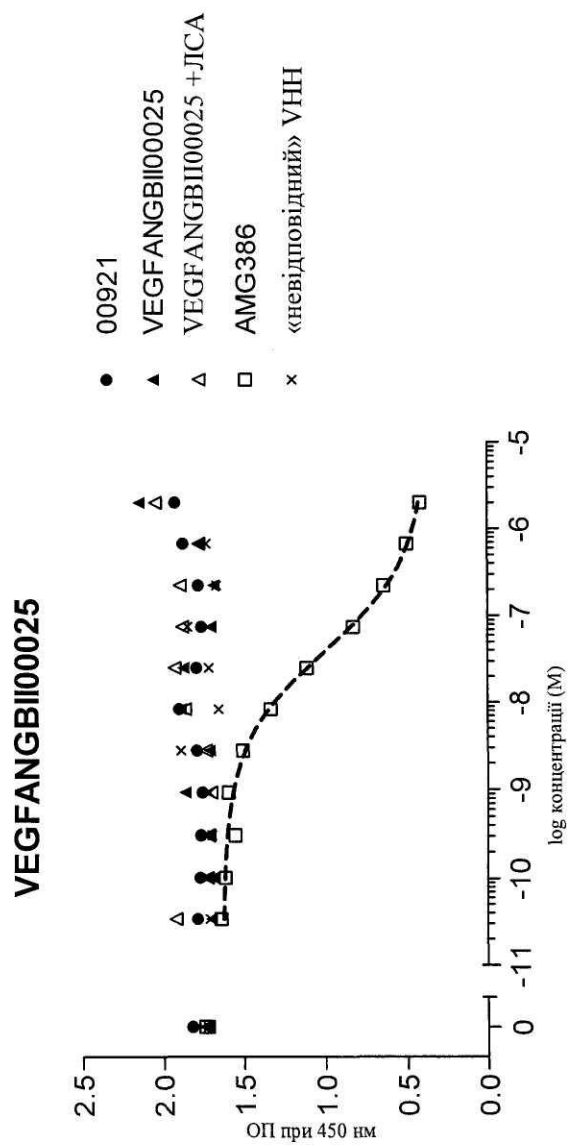
Фіг. 35-3В



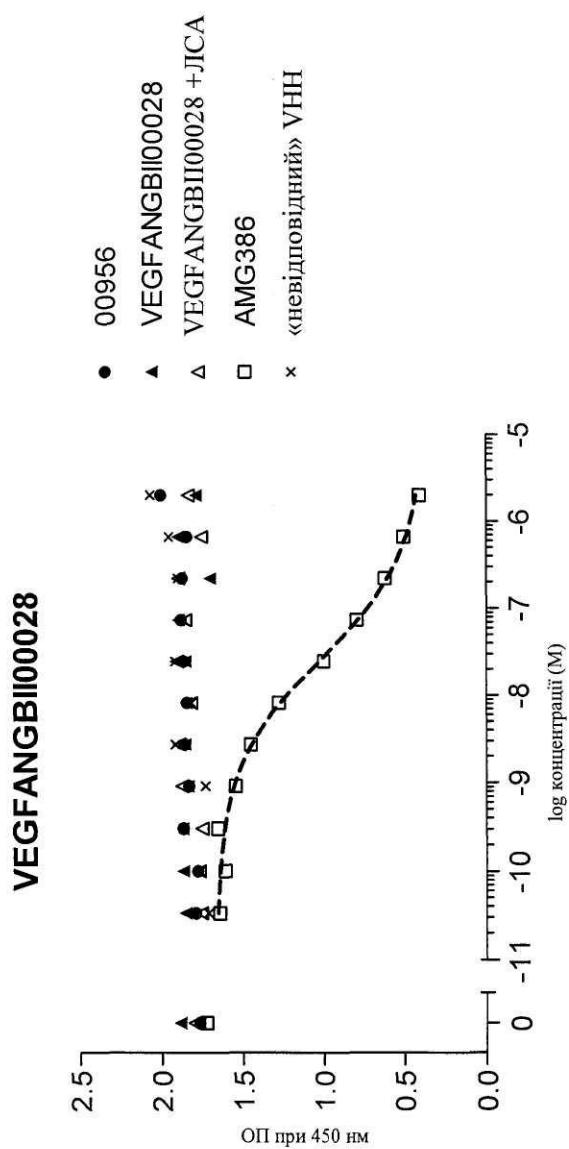
Фиг. 36А



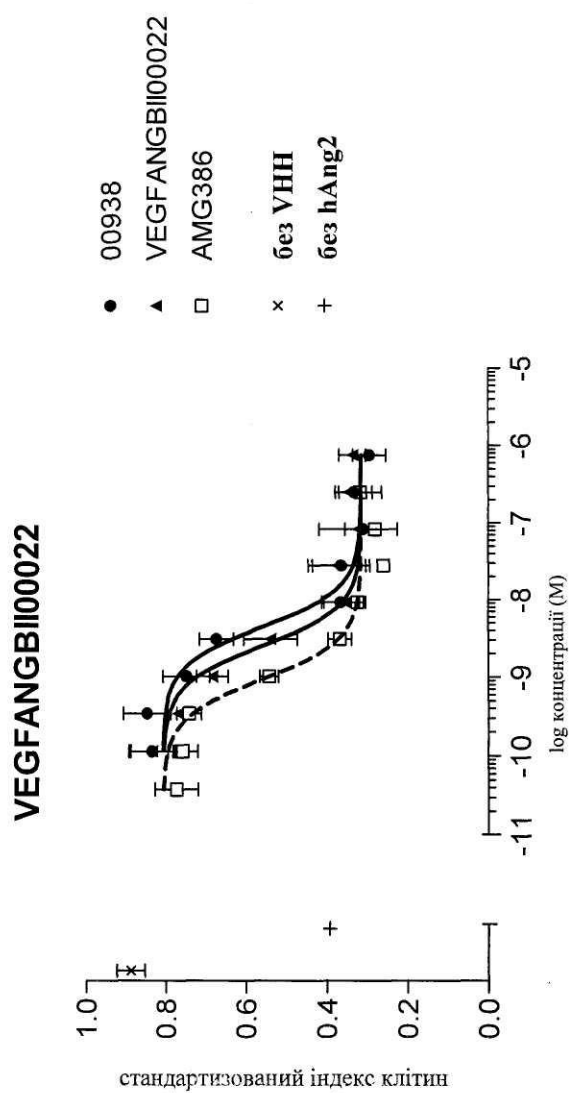
Фиг. 36Б



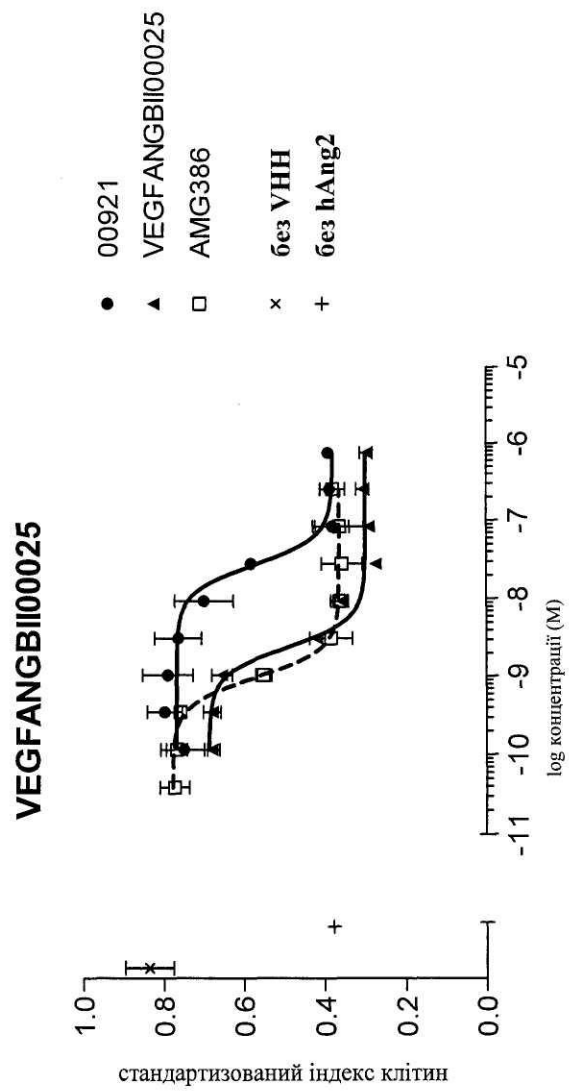
Фір. 36В



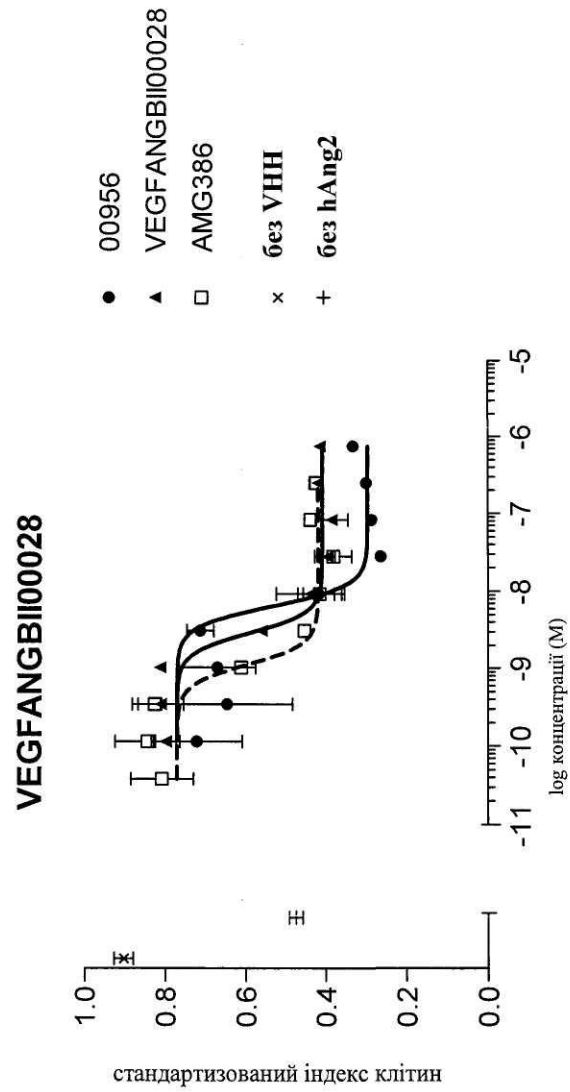
Фиг. 37А



Фіг. 37Б



Фір. 37В



Комп'ютерна верстка М. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601