



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2021.02.01

(21) Номер заявки

201390666

(22) Дата подачи заявки

2011.11.07

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(54) CXCR2-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ПОЛИПЕПТИДЫ

(31) **61/411,083**

(32) **2010.11.08**

(33) **US**

(43) **2013.11.29**

(86) **PCT/EP2011/069571**

(87) **WO 2012/062713 2012.05.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

АБЛИНКС Н.В. (BE)

(72) Изобретатель:

**Брэдли Мишелль, Браун Зарин,
Чарлтон Стивен Джон (GB), Кроуми
Карен, Домбрехт Бруно, Стеффенсен
Сорен (BE), Ван Хеке Гино (GB)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) **US-A-5440021**

WO-A2-0172830

MUYLDERMANS S.: "SINGLE DOMAIN CAMEL ANTIBODIES: CURRENT STATUS", REVIEWS IN MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 74, no. 4, 1 June 2001 (2001-06-01), pages 277-302, XP001057480, ISSN: 1389-0352, DOI: 10.1016/S1389-0352(01)00021-6 the whole document in particular figure 6

HOLLIGER PHILIPP ET AL.: "ENGINEERED ANTIBODY FRAGMENTS AND THE RISE OF SINGLE DOMAINS", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 23, no. 9, 1 September 2005 (2005-09-01), pages

1126-1136, XP008076746, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT1142 the whole document in particular fig. 1

WO-A2-2004081026

WO-A2-2010043650

GABELLINI C. ET AL.: "Functional activity of CXCL8 receptors, CXCR1 and CXCR2, on human malignant melanoma progression", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 45, no. 14, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 2618-2627, XP026641847, ISSN: 0959-8049, DOI: 10.1016/J.EJCA.2009.07.007 [retrieved on 2009-08-13] abstract; figures 4-6

RAIMONDO M. ET AL.: "S2008 CXC-Chemokine/CXCR2 Biological Axis Promotes Angiogenesis In Vitro and In Vivo in Pancreatic Cancer", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, vol. 136, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages A-312, XP026111971, ISSN: 0016-5085, DOI: 10.1016/S0016-5085(09)61424-4 [retrieved on 2009-05-01] abstract

BARNES PETER J.: "New therapies for chronic obstructive pulmonary disease.", MEDICAL PRINCIPLES AND PRACTICE: INTERNATIONAL JOURNAL OF THE KUWAIT UNIVERSITY, HEALTH SCIENCE CENTRE 2010 LNKD-PUBMED:20639653, vol. 19, no. 5, 14 June 2010 (2010-06-14), pages 330-338, XP002673462, ISSN: 1423-0151 Abstract pages 333, 336 Epub 2010 Jul 14

TRAVES SUZANNE L. ET AL.: "Specific CXC but not CC chemokines cause elevated monocyte migration in COPD: a role for CXCR2", JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY AUG 2004 LNKD-PUBMED:15155777, vol. 76, no. 2, August 2004 (2004-08), pages 441-450, XP009157874, ISSN: 0741-5400 abstract

(57) Изобретение относится к полипептидам, направленным против хемокинового рецептора CXCR2 или специфически связывающимся с этим рецептором, в частности к полипептидам, способным модулировать передачу сигнала от CXCR2. Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, к векторам и к клеткам-хозяевам, способным экспрессировать полипептиды по изобретению, к фармацевтическим композициям, содержащим указанные полипептиды, и к применению указанных полипептидов и композиций для лечения заболеваний, связанных с нарушением функции CXCR2.

Настоящее изобретение относится к полипептидам, направленным против хемокинового рецептора CXCR2 или специфически связывающимся с этим рецептором, в частности к полипептидам, способным модулировать передачу сигнала от CXCR2. Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, к векторам и к клеткам-хозяевам, способным экспрессировать полипептиды по изобретению, к фармацевтическим композициям, содержащим полипептиды, и к применению указанных полипептидов и композиций для лечения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и других заболеваний, связанных с нарушением функции CXCR2.

Предшествующий уровень техники

Термин "хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ)" используется для описания ряда расстройств, характеризующихся нарушением проходимости дыхательных путей, которое в большинстве случаев является прогрессирующим и связано с аномальным воспалительным ответом легких на токсичные частицы, что приводит к деструкции паренхимы легких и к снижению функции дыхательных путей (Barnes P.J. et al., 2003, Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur. Respir J.*, 22, 672-688; Barnes P.J. et al., 2004, Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol. Rev.* 56, 515-548). Хотя за развитие ХОБЛ ответственны генетические факторы и факторы окружающей среды, однако самой главной причиной развития такого заболевания является курение с рецидивирующей инфекцией легких, приводящей к прогрессирующему ухудшению функции легких. Прекращение курения замедляет прогрессирование заболевания лишь на ранней стадии, а после появления явных симптомов дает незначительный эффект. С ХОБЛ связано несколько сопутствующих патологических состояний, таких как астма, сердечно-сосудистое заболевание, депрессия и мышечное истощение (Mannino D.M. and Buist S., 2007 Global burden of COPD: risk factors, prevalence and future trends. *Lancet*, 370, 765-773).

Среди хемотаксических факторов преобладают хемокины, а поэтому они играют ключевую роль в развитии хронического воспаления легких при ХОБЛ и в его последующих резких обострениях. Биологическая активность хемокинов IL-8 (CXCL8), GRO α (CXCL1) и ENA-78 (CXCL5) опосредуется двумя популяциями рецепторов CXCR1 и CXCR2 клеточной поверхности, которые присутствуют на лейкоцитах и на клетках многих других типов в организме. Миграция лейкоцитов опосредуется, главным образом, рецептором CXCR2, который связывается с несколькими лигандами, включая IL-8, GRO α , β , γ , ENA-78 и GCP-2. В противоположность этому CXCR1 селективно активируется IL-8 и в меньшей степени GCP-2. При этом остается неясным, может ли хемотаксис нейтрофилов человека *in vivo* опосредоваться одним или обоими рецепторами.

Аминокислотная последовательность CXCR2 на 78% гомологична аминокислотной последовательности CXCR1, и оба эти рецептора присутствуют на нейтрофилах с различными профилями распределения. Экспрессия CXCR2 на различных клетках и тканях, включая CD8⁺-Т-клетки, НК, моноциты, тучные клетки, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, клетки гладких мышц и клетки-хозяева центральной нервной системы, позволяет предположить, что этот рецептор может играть главную функциональную роль как в симптоматических состояниях, так и в патофизиологии ряда острых и хронических заболеваний. Активация CXCR2 стимулирует связывание рецептора с Gi-семейством белков, связывающихся с гуаниновыми нуклеотидами, что, в свою очередь, приводит к стимуляции высвобождения внутриклеточных фосфатов инозита, к повышению уровня внутриклеточного Ca²⁺ и под действием ERK1/2-зависимых механизмов к фосфорилированию внутриклеточных белков, связанных с прямой миграцией клеток в соответствии с градиентом хемокинов. После активации CXCR2 фосфорилируется и быстро интернализуется под действием аррестин/динамин-зависимых механизмов, что приводит к десенситилизации рецепторов. Этот процесс аналогичен процессу, наблюдаемому для большинства других GPCR, но скорость и степень индуцируемой агонистом интернализации CXCR2 выше, чем скорость и степень интернализации, наблюдаемой для CXCR1 (Richardson R., Pridgen B.C., Naribabu B., Ali H., Synderman R. 1998 Differential cross-regulation of the human chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. Evidence for time-dependent signal generation. *J. Biol. Chem*, 273, 23830-23836).

Долгое время считалось, что IL-8 является нейтрофильным медиатором воспаления при ХОБЛ (Keatings V.M. et al., 1996, Differences in IL-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with COPD and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153, 530-534; Yamamoto C. et al., 1997, Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest*, 112, 505-510). При биопсии бронхиальных путей, малых дыхательных путей и паренхимы легких у пациентов с ХОБЛ наблюдается инфильтрация Т-клеток и повышенное число нейтрофилов, особенно в просветах дыхательных путей (Hogg J.C. et al., 2004, The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Eng. J. Med.* 350, 2645-2653). Число нейтрофилов увеличивается в легких пациентов с ХОБЛ, что коррелирует со степенью тяжести заболевания (Keatings V.M. et al., 1996, Differences in IL-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with COPD and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153, 530-534). Кроме того, в мокроте пациентов с ХОБЛ повышаются уровни TNF α , что приводит к индуцированию высвобождения IL-8 из эпителиальных клеток дыхательных путей (Keatings). Концентрация GRO α заметно увеличивается в индуцированной мокроте и в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ), взятом у пациентов с

ХОБЛ, в отличие от концентрации GRO α у обычных курильщиков и у некурящих людей (Traves S.L. et al., 2002, Increased levels of the chemokines GRO α and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax*, 57, 50-595; Pesci A. et al., 1998, Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with COPD. *Eur. Respir J.* 12, 380-386). GRO α секретируется альвеолярными макрофагами и эпителиальными клетками дыхательных путей в ответ на TNF α -стимуляцию и селективно активирует CXCR2, который обладает хемотаксическим действием на нейтрофилы и моноциты. У пациентов с ХОБЛ наблюдается усиление моноцитарного хемотаксического ответа на GRO α , которое может быть связано с повышением метаболизма или рециклинга CXCR2 в этих клетках (Traves S.L. et al., 2004, Specific CXC but not CC chemokines cause elevated monocyte migration in COPD: a role for CXCR2, *J. Leukoc. Biol.* 76, 441-450). Вирусная и бактериальная инфекция легких часто приводит к серьезному обострению заболевания у пациентов с ХОБЛ, которое характеризуется повышением числа нейтрофилов в дыхательных путях (Wedzicha J.A., Seemungal T.A., 2007, COPD exacerbations: defining their cause and prevention, *Lancet* 370 (9589): 786-96). Бронхиальная биопсия пациентов с острым тяжелым обострением ХОБЛ выявила значительное увеличение уровня экспрессии мРНК ENA-78, IL-8 и CXCR2 (Qiu Y. et al., 2003, Biopsy neutrophilia, neutrophil chemokine and receptor gene expression in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168, 968-975), и повышенное количество нейтрофилов в мокроте (Bathoorn E., Liesker J. Jw., Postma D.S. et al., Change in inflammation in out-patient COPD patients from stable phase to a subsequent exacerbation, (2009) *Int. J. COPD*, 4(1): 101-9), что позволяет предположить о потенциальной роли рецептора CXCR2 в развитии ХОБЛ и в резком обострении этого заболевания. В биоптатах бронхов наблюдается повышенный уровень экспрессии мРНК CXCR2, и этот уровень экспрессии коррелирует с присутствием нейтрофилов в тканях (Qiu 2003). ENA-78 высвобождается, главным образом, из эпителиальных клеток, при этом значительное повышение уровня экспрессии ENA-78 в эпителиальных клетках наблюдается при обострении ХОБЛ (Qiu 2003). Поскольку в дыхательных путях при ХОБЛ наблюдаются повышенные концентрации IL-8, GRO α и ENA-78, и все три лиганда передают сигнал посредством CXCR2, то блокирование этого общего рецептора селективными антагонистами может служить эффективной противовоспалительной стратегией при лечении указанного заболевания.

ХОБЛ развивается медленно и постепенно прогрессирует, и прогрессирование этого заболевания традиционно оценивают с помощью тестов на функцию легких, т.е. спирометрического измерения форсированного объема выдоха в одну секунду (FEV1). Пациенты с предсказанным FEV1 <50% классифицируются как пациенты с тяжелым заболеванием. Функция легких четко коррелирует с коэффициентом смертности, т.е. в течение 12 лет умирает приблизительно 35% пациентов с тяжелой формой ХОБЛ, и лишь 5% пациентов с легкой или умеренной формой этого заболевания. По смертности во всем мире ХОБЛ занимает четвертое место (по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) *World Health Report, Geneva, 2000*. Эти данные доступны на сайте URL: http://www.who.int/whr/2000/en/whr00_annex_en.pdf) и в ближайшее десятилетие заболеваемость и смертность от этой болезни, скорее всего, будет повышаться (Lopez A.D., Shibuya K., Rao C. et al., 2006, Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections, *Eur. Respir J.*, 27(2), 397-412). Обострения этого заболевания являются ключевым фактором и выражаются в постепенном протекающем по спирали ухудшении состояния здоровья пациента, и эти обострения в высокой степени ответственны за подавляющее большинство случаев госпитализации больных с ХОБЛ (BTS (British Thoracic Society), 2006, Burden of Lung Disease Report, 2nd ed, http://www.brit-thoracic.org.Uk/Portals/0/Library/BTS%20Publications/burden_of_lung_disease2007.pdf). Средние ежегодные коэффициенты для симптоматических и диагностированных обострений составляют 2,3 и 2,8 (O'Reilly J.F., Williams A.E., Holt K. et al., 2006, *Prim Care Respir J.* 15(6): 346-53). Диагностика на ранней стадии заболевания и назначение подходящего лечения пациенту с обострением, а также соответствующие профилактические меры помогут снизить нагрузку на уже перегруженные клиники. Применяемые в настоящее время способы лечения ХОБЛ являются, главным образом, паллиативными, и в настоящее время не существует каких-либо способов лечения, которые могли бы приостановить ухудшение функции легких или прогрессирующую деструкцию дыхательных путей, связанную с этим заболеванием. Для ослабления симптомов и лечения обострения заболевания применяются современные методы терапии, такие как введение β -адренергических бронхолитических средств кратковременного и пролонгированного действия, введение антихолинергических средств путем ингаляции (мускариновых антагонистов) и введение кортикостероидов путем ингаляции. Существенным недостатком современной терапии с применением кортикостероидов является то, что со временем кортикостероиды становятся неэффективными, поскольку у пациентов вырабатывается резистентность к этим кортикостероидам, что приводит к инактивации противовоспалительного действия этих лекарственных средств. Совершенно очевидно, что существует огромная и пока еще неудовлетворенная потребность в новых лекарственных средствах, позволяющих предотвращать прогрессирование ХОБЛ. Антагонисты хемокиновых рецепторов являются привлекательным средством для терапии ХОБЛ, поскольку транспорт воспалительных клеток при ХОБЛ управляется множеством хемокинов, а поэтому блокада хемокиновых рецепторов низкомолекулярными антагонистами может служить эффективной противовоспалительной стратегией при лечении такого за-

болевания. Главным отличительным признаком ХОБЛ является усиление воспалительного ответа, наблюдаемое у обычных курильщиков, а поэтому терапия ХОБЛ ставит своей целью не полное подавление инфильтрации воспалительных клеток, а лишь снижение их числа до уровней, наблюдаемых у здоровых курильщиков без ХОБЛ. Антагонисты CXCR2, благодаря их специфическому действию, действуют не по общему механизму иммуносупрессии, связанному с действием стероидов, а по механизму сохранения CXCR1, который позволяет активировать базальные нейтрофилы, что является важным фактором для защиты хозяина от ХОБЛ и от СН (сердечной недостаточности). В настоящее время, большинство лекарственных средств против ХОБЛ вводят путем ингаляции для снижения системных побочных эффектов, однако поскольку антагонисты хемокинов действуют на рецепторы, экспрессируемые в воспалительных клетках кровотока, такое системное введение должно быть оптимальным. Таким образом, необходимо разработать эффективное лекарственное средство, которое способно достигать малых дыхательных путей и паренхимы легких, пораженных ХОБЛ.

Хемокиновые рецепторы, в противоположность цитокиновым и интерлейкиновым рецепторам, принадлежат к суперсемейству рецепторов 7ТМ-GPCR, дающих сильный "лекарственный" эффект. Несмотря на это, предпринятые ранее попытки обнаружить сильные антагонисты столкнулись с еще большими трудностями, чем это ожидалось исходя из экспериментов с рецепторами GPCR, имеющими небольшие пептидные или биогенные аминовые лиганды. Попытки разработать программы обнаружения небольших молекул лекарственных средств, направленные на выявление антагонистов хемокиновых рецепторов, позволяют постепенно понять идиосинкразию хемокиновых рецепторов и структурных элементов, необходимых для функционирования небольших молекул в качестве антагонистов. Интересно отметить, что структурное разнообразие антагонистов СС-хемокиновых рецепторов, представленных рядом фундаментально отличающихся серий идентифицированных химических соединений, значительно превышает структурное разнообразие антагонистов СХС-хемокиновых рецепторов, что дает основание предположить, что относительные трудности в выявлении антагонистов могут заключаться в различии между двумя классами рецепторов.

В общих чертах было подтверждено, что хемокиновые рецепторы являются труднодоступными мишенями для их подавления, и были предприняты огромные усилия для идентификации сильных селективных антагонистов CXCR2. Низкомолекулярный антагонист CXCR2 был впервые описан в 1998 г., поскольку был разработан ряд неконкурентных аллостерических антагонистов CXCR2, некоторые из которых в настоящее время находятся на стадии клинических испытаний. Тем не менее, совершенно очевидно необходимо разработать более эффективные и сильные антагонисты функции CXCR2.

Молекулы, принадлежащие к классу иммуноглобулинов, находят все более широкое применение в медицине за последние десять лет или более. Специфичность этих молекул к мишени и возможность их конструирования с применением рекомбинантных методов сулит огромные перспективы с точки зрения разработки в высокой степени направленного лечения заболевания. Молекулы иммуноглобулинов многих типов и модифицированные молекулы иммуноглобулинов, включая стандартные четырехцепочечные антитела, Fab- и F(ab)₂-фрагменты, однодоменные антитела (D(ab)), одноцепочечные Fv и нанотела, являются потенциально доступными для их соответствующего конструирования. Эти молекулы будут более подробно обсуждаться ниже в разделах настоящего описания, относящихся к полипептидам, сконструированным так, чтобы они были непосредственно направлены по меньшей мере на два эпитопа CXCR2.

Поэтому целью настоящего изобретения является разработка новых средств для профилактики или лечения хронической обструктивной болезни легких или ХОБЛ и других заболеваний, связанных с нарушением функций хемокинового рецептора CXCR2.

Другой целью настоящего изобретения является разработка способа лечения или профилактики ХОБЛ и других заболеваний, связанных с нарушением функций CXCR2, где указанным способом является иммунотерапия.

Еще одной целью настоящего изобретения является получение полипептида, содержащего CDR иммуноглобулина и представляющего собой антагонист передачи сигнала CXCR2.

Описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере два антигенсвязывающих домена иммуноглобулина, где полипептид направлен против хемокинового рецептора CXCR2 или связывается с этим рецептором, и где указанный полипептид включает первый антигенсвязывающий домен, распознающий первый эпитоп на CXCR2, и второй антигенсвязывающий домен, распознающий второй эпитоп на CXCR2. Предпочтительный полипептид по изобретению содержит первый антигенсвязывающий домен, способный связываться с линейным пептидом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, и второй антигенсвязывающий домен, который либо не способен связываться с указанным линейным пептидом, либо связывается с этим пептидом с меньшей аффинностью. SEQ ID NO: 7 представляет собой первые 19 N-концевых аминокислот CXCR2 человека. Предпочтительный полипептид по изобретению является бипаратопным. Используемый в настоящем документе термин "бипаратопный" означает, что данный полипептид содержит два антигенсвязывающих домена, распознающих два различных эпитопа на одном и том же белке-мишени. Однако полипептиды, которые

являются мультипаратопными, т.е. содержат антигенсвязывающие домены, распознающие три, четыре или более эпитопов на одном и том же белке-мишени, также входят в объем настоящего изобретения, поскольку они представляют собой полипептиды, которые являются би- или мультипаратопными и polyvalentными, т.е. содержат антигенсвязывающие домены, распознающие один или несколько других белков-мишеней.

В предпочтительных вариантах осуществления полипептидов по изобретению аминокислотная последовательность, содержащая первый антигенсвязывающий домен, и аминокислотная последовательность, содержащая второй антигенсвязывающий домен, связаны друг с другом линкерной областью. Как более подробно обсуждается ниже, линкер может происходить, а может и не происходить от иммуноглобулина, но предпочтительно он является пептидом.

В особенно предпочтительных полипептидах по изобретению указанный первый антигенсвязывающий домен содержится в одном переменном домене первого иммуноглобулина, а указанный второй антигенсвязывающий домен содержится в одном переменном домене второго иммуноглобулина. По меньшей мере один из указанных отдельных переменных доменов первого и второго иммуноглобулина может представлять собой V_L -домен или его фрагмент, либо он может представлять собой V_H -домен или его фрагмент. Полипептиды, где каждый первый и второй антигенсвязывающие домены содержатся в V_L -доменах или их фрагментах, или где каждый первый и второй антигенсвязывающие домены содержатся в V_H -доменах или их фрагментах, входят в объем настоящего изобретения. Полипептид по изобретению может содержать аминокислотные последовательности обоих V_L и V_H или их фрагменты в одной молекуле.

В других предпочтительных вариантах осуществления изобретения первый и второй антигенсвязывающие домены содержатся в одном из переменных доменов первого и второго иммуноглобулина, которые представляют собой доменные антитела (dAb). В наиболее предпочтительных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один, предпочтительно оба указанных первый и второй антигенсвязывающие домены содержатся в одном из переменных доменов иммуноглобулина, которые представляют собой V_{HH} -домен или его фрагмент, происходящий от одной тяжелой цепи антитела с тяжелой цепью, полученного от животного семейства верблюжьих, или его гуманизированный вариант, в который была введена по меньшей мере одна замена человеческого аминокислотного остатка в каркасной области.

Один переменный домен иммуноглобулина, который имеет аминокислотную последовательность V_{HH} или его фрагмент или вариант, происходящий только от антитела с тяжелой цепью, полученного от животного семейства верблюжьих, может альтернативно называться в настоящем документе "V_{HH}-доменом" или его фрагментом, или "нанотелом". Следует отметить, что Nanobody®, Nanobodies® и Nanoclone® (нанотело, нанотела и наноклон) зарегистрированы под торговыми знаками Ablynx N.V.

В полипептидах по изобретению каждый антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну определенную в настоящем документе CDR, предпочтительно две или три CDR. В предпочтительных полипептидах по изобретению предпочтительной структурой одного из переменных доменов иммуноглобулина является V_{HH} -домен или нанотело, а именно структура

FR-CDR-FR-CDR-FR-CDR-FR,

где CDR и FR дополнительно определены ниже.

Предпочтительные бипаратопные нанотела по изобретению имеют одну из нижеследующих структур:

- i) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,
- ii) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8-линкер-HLE,
- iii) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-HLE-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

где если FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 содержит первый антигенсвязывающий домен (связывающийся с линейной SEQ ID NO: 7), то FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 содержит второй антигенсвязывающий домен (не связывающийся с линейной SEQ ID NO: 7), а если FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 содержит второй антигенсвязывающий домен (не связывающийся с линейной SEQ ID NO: 7), то FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 содержит первый антигенсвязывающий домен (связывающийся с линейной SEQ ID NO: 7), а HLE представляет собой связующее звено, способствующее увеличению времени полужизни *in vivo*.

Фрагменты или варианты предпочтительного бипаратопного нанотела, описанного выше, входят в объем настоящего изобретения, включая варианты осуществления, в которых CDR и FR происходят от животного семейства верблюжьих, или варианты, в которых одна или несколько FR имеют по меньшей мере одну замену человеческим остатком, предпочтительно являются полностью гуманизированными.

Особенно предпочтительными бипаратопными нанотелами по изобретению являются антитела, обозначенные в настоящем документе 163D2/127D1, 163E3/127D1, 163E3/54B12, 163D2/54B12, 2B2/163E3, 2B2/163D2, 97A9/2B2 и 97A9/54B12 и имеющие аминокислотные последовательности, пред-

ставленные в табл. 13, в частности их варианты, в которых FR включают последовательность с оптимизированными аминокислотными заменами, определенными ниже и представленными в описании компонентов нанотел в табл. 32.

Особенно предпочтительные дополнительные бипаратопные нанотела по изобретению представлены в табл. 33.

Полипептиды по изобретению представляют собой модуляторы передачи сигнала CXCR2, которые блокируют, снижают или ингибируют активность CXCR2. Они могут ингибировать связывание природного лиганда, например GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ. Предпочтительно полипептиды по изобретению, в частности бипаратопные нанотела по изобретению, обладают способностью перекрестно блокировать связывание CXCR2 с одним или несколькими из 163D2/127D1, 163E3/127D1, 163E3/54B12, 163D2/54B12, 2B2/163E3, 2B2/163D2, 97A9/2B2 и 97A9/54B12, обсуждаемые выше.

Описанное в настоящем документе изобретение также охватывает структурные блоки одновалентных полипептидов, которые используются при конструировании би- или мультипаратопных или поливалентных нанотел. Предпочтительными одновалентными нанотелами являются каждый и все полипептиды с аминокислотными последовательностями, представленными в табл. 9, 34, или с аминокислотными последовательностями, в которых по меньшей мере одна из каркасных областей имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности, представленной в табл. 9 или 34. Предпочтительными одновалентными нанотелами являются нанотела, представленные в табл. 9, и где по меньшей мере одна последовательность имеет оптимизирующую аминокислотную замену в каркасной области, такой как каркасная область нанотел, представленных в табл. 32 или 34. Особенно предпочтительным является одновалентное нанотело, обозначенное 137B7, и его оптимизированная последовательность и их варианты.

Предпочтительные полипептиды по изобретению связываются с эпитопом, состоящим из аминокислот F11, F14 и W15 SEQ ID NO: 1 (CXCR2). В предпочтительных бипаратопных полипептидах по изобретению, таких как бипаратопные нанотела, второй антигенсвязывающий домен связывается с эпитопом, расположенным во внешних петлях CXCR2 человека (аминокислотные остатки 106-120, 184-208 и 274-294 SEQ ID NO: 1). В одном из вариантов изобретения указанный эпитоп является конформационным. В одном из вариантов изобретения указанный эпитоп содержит аминокислотные остатки W112, G115, 1282 и T285 SEQ ID NO: 1.

Настоящее изобретение также включает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любой полипептид по изобретению, а также нуклеиновые кислоты, кодирующие их фрагменты, такие как нуклеиновые кислоты, кодирующие отдельные нанотела, которые содержатся в бипаратопных нанотелах. Векторы, содержащие нуклеиновые кислоты по изобретению, и клетки-хозяева, содержащие указанные векторы и способные экспрессировать полипептид по изобретению, также входят в объем настоящего изобретения.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим полипептид по изобретению в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или наполнителем. Поскольку полипептиды по изобретению способны блокировать, ингибировать или снижать активность CXCR2, то они могут быть использованы для лечения заболеваний, в развитии которых определенную роль играет нарушение передачи сигнала от CXCR2. Такими заболеваниями могут быть атеросклероз, гломерулонефрит, воспалительное заболевание кишечника (болезнь Крона), ангиогенез, рассеянный склероз, псориаз, возрастная дегенерация желтого пятна, глазная болезнь Бехчета, увеит, немелкоклеточная карцинома, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак пищевода, меланома, гепатоцеллюлярная карцинома или ишемическое реперфузионное повреждение. Такими заболеваниями могут быть также расстройства дыхательных путей, такие как кистозный фиброз, астма в тяжелой форме, обострение астмы, аллергическая астма, острое поражение легких, острый респираторный дистресс-синдром, идиопатический фиброз легких, ремоделирование дыхательных путей, синдром облитерирующего бронхолита или бронхопупьмонарная дисплазия.

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения полипептиды по изобретению применяются для лечения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) или обострения ХОБЛ, которые характеризуются миграцией лейкоцитов, в частности нейтрофилов, в паренхиму легких с ее последующей деструкцией, где миграция опосредуется передачей CXCR2-сигнала. Благодаря способности полипептидов по изобретению блокировать, ингибировать или снижать активность CXCR2, эти полипептиды являются наилучшими кандидатами на их применение для профилактики или лечения указанного заболевания.

Для лечения человека предпочтительно, чтобы полипептид по изобретению был направлен непосредственно против CXCR2 человека или специфически связывался с ним. Однако более предпочтительно, чтобы указанный полипептид мог перекрестно реагировать с CXCR2 приматов, в частности с CXCR2 собакоподобных обезьян, для того, чтобы соответствующий тест на токсичность можно было проводить на указанных обезьянах. Полипептиды по изобретению в том случае, если они применяются в ветеринарии, могут быть направлены непосредственно против гомологов CXCR2 или могут специфически связываться с указанными гомологами, происходящими от животных других видов.

Другие аспекты изобретения будут очевидны из нижеследующего обсуждения.

Описание графического материала

На фиг. 1 представлены кривые ответа, построенные по данным о способности двух нанотел и бипаратопного нанотела по изобретению блокировать высвобождение [³⁵S]GTPγS из CHO-CXCR2-мембран, стимулированное агонистом GROα, где указанную способность измеряли при возрастающих концентрациях нанотела.

На фиг. 1a представлены данные для нанотела 54B12 (SEQ ID NO: 90 в табл. 9), на фиг. 1b представлены данные для нанотела 163E3 (SEQ ID NO: 42 в табл. 9), а на фиг. 1c представлены данные для бипаратопного нанотела 54B12/163E3 (SEQ ID NO: 68 в табл. 13).

Определения.

Далее приводятся описание изобретения, примеры и формула изобретения.

а) Если это не указано или не оговорено особо, то все используемые в настоящем документе термины имеют свои общепринятые значения, известные специалистам. Например, описание этих терминов можно найти в стандартных руководствах, упомянутых ниже. Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd. Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel et al., eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, New York, N.Y., (1985); Old et al., "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", 2nd edition, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt et al., "Immunology" (6th. Ed.), Mosby/Elsevier, Edinburgh (2001); Roitt et al., Roitt's Essential Immunology, 10 Ed. Blackwell Publishing, UK (2001); and Janeway et al., "Immunobiology" (6th Ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York (2005).

б) Если это не оговорено особо, то термин "иммуноглобулин" или "последовательность иммуноглобулина", независимо от того, относится ли он к антителу с тяжелой цепью или к стандартному 4-цепочечному антителу, используется в настоящем документе как общий термин, включающий полно-размерное антитело, его отдельные цепи, а также все его части, домены или фрагменты (включая, но не ограничиваясь ими, антигенсвязывающие домены или их фрагменты, такие как V_{HH}-домены или V_H/V_L-домены соответственно). Кроме того, используемый в настоящем документе термин "последовательность" (например, в таких словосочетаниях, как "последовательность иммуноглобулина", "последовательность антитела", "последовательность вариабельного домена", "последовательность V_{HH}" или "последовательность белка"), в общих чертах, включает соответствующую аминокислотную последовательность, а также последовательности нуклеиновой кислоты или нуклеотидные последовательности, кодирующие указанную аминокислотную последовательность, если в контексте настоящего описания не подразумевается более ограниченная интерпретация.

с) Если это не оговорено особо, то термин "один вариабельный домен иммуноглобулина" используется в настоящем документе как общий термин, включающий, но не ограничивающийся ими, антигенсвязывающие домены или фрагменты, такие как V_{HH}-домены, или V_H- или V_L-домены соответственно. Термины "антигенсвязывающие молекулы" или "антигенсвязывающие белки" являются синонимами и также включают понятие "нанотела". Один из вариабельных доменов иммуноглобулина также представляет собой последовательность вариабельного домена легкой цепи (например, V_L-последовательность) или последовательность вариабельного домена тяжелой цепи (например, V_H-последовательность), более конкретно они могут представлять собой последовательности вариабельного домена тяжелой цепи, происходящие от стандартного четырехцепочечного антитела, или последовательности вариабельного домена тяжелой цепи, происходящие от антитела с тяжелой цепью. В соответствии с этим отдельные вариабельные домены иммуноглобулина могут представлять собой доменные антитела или последовательности иммуноглобулина, которые могут быть использованы в качестве доменных антител, т.е. однодоменных антител, или последовательности иммуноглобулина, которые могут быть использованы в качестве однодоменных антител, т.е. "dAb", или последовательности иммуноглобулина, которые могут быть использованы в качестве dAb или нанотел, включая, но не ограничиваясь ими, последовательности V_{HH}. Настоящее изобретение включает последовательности иммуноглобулина различного происхождения, включая последовательности иммуноглобулина, происходящие от мышей, крыс, кроликов, ослов, человека и животных семейства верблюжьих. Один вариабельный домен иммуноглобулина включает полностью человеческую последовательность, гуманизированную последовательность, последовательность, оптимизированную каким-либо другим способом, или химерную последовательность иммуноглобулина. Один вариабельный домен иммуноглобулина и структура одного вариабельного домена иммуноглобулина могут рассматриваться, но не ограничиваются ими, как вариабельный домен и его структура, состоящие из четырех каркасных областей "FR", которые известны специалистам и упоминаются в настоящем документе как "каркасная область 1" или "FR1"; "каркасная область 2" или "FR2"; "каркасная область 3" или "FR3"; и "каркасная область 4" или "FR4" соответственно, где указанные каркасные области прерываются тремя гипервариабельными областями (комплементарность-определяющими областями) или "CDR", которые известны специалистам как "гипервариабельная область 1" или "CDR1"; "гипервариабельная область 2" или "CDR2" и "гипервариабельная область 3" или "CDR3" соответственно.

d) Если это не оговорено особо, то все методы, стадии, способы и модификации, которые подробно не описаны в настоящей заявке, могут быть осуществлены и были осуществлены способом, известным *per se*, как очевидно для специалиста в данной области. В этой связи можно обратиться к упомянутым в настоящем документе стандартным руководствам и общим справочным материалам, а также к цитируемым в них работам, и, например, к нижеследующим публикациям Presta, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006, 58 (5-6): 640-56; Levin and Weiss, *Mol. Biosyst.* 2006, 2(1): 49-57; Irving et al., *J. Immunol. Methods*, 2001, 248(1-2), 31-45; Schmitz et al., *Placenta*, 2000, 21 Suppl. A, S106-12, Gonzales et al., *Tumour Biol.*, 2005, 26(1), 31-43, в которых описаны методы конструирования белков, например метод созревания аффинности и другие методы повышения специфичности и улучшения других нужных свойств белков, таких как иммуноглобулины.

e) Аминокислотные остатки обозначены стандартным трехбуквенным или однобуквенным кодом.

f) Для сравнения двух или более нуклеотидных последовательностей процент "идентичности последовательностей", т.е. процент идентичности между первой нуклеотидной последовательностью и второй нуклеотидной последовательностью, может быть вычислен или определен путем деления [числа нуклеотидов в первой нуклеотидной последовательности, идентичных нуклеотидам в соответствующих положениях во второй нуклеотидной последовательности] на [общее число нуклеотидов в первой нуклеотидной последовательности] и умножения на [100%], где каждая делеция, инсерция, замена или добавление нуклеотида во второй нуклеотидной последовательности, сравниваемой с первой нуклеотидной последовательностью, рассматривается как различие в одном нуклеотиде (положении); либо такой процент может быть вычислен с использованием подходящего компьютерного алгоритма или метода. Степень идентичности двух или более нуклеотидных последовательностей может быть вычислена с использованием известного компьютерного алгоритма для выравнивания последовательностей, такого как NCBI Blast v2.0, с использованием стандартных параметров. Некоторые другие методы, компьютерные алгоритмы и параметры для определения степени идентичности последовательностей описаны, например, в WO 04/037999, EP 0967284, EP 1085089, WO 00/55318, WO 00/78972, WO 98/49185 и GB 2357768 A. Обычно, для определения "процента идентичности" двух нуклеотидных последовательностей в соответствии с описанным выше методом вычисления нуклеотидную последовательность с наибольшим числом нуклеотидов обозначают как "первую" нуклеотидную последовательность, а другую нуклеотидную последовательность обозначают как "вторую" нуклеотидную последовательность.

g) Для сравнения двух или более аминокислотных последовательностей, процент "идентичности последовательностей", т.е. процент идентичности между первой аминокислотной последовательностью и второй аминокислотной последовательностью (также называемый в настоящем документе "идентичностью аминокислотных последовательностей"), может быть вычислен или определен путем деления [числа аминокислотных остатков в первой аминокислотной последовательности, идентичных аминокислотным остаткам в соответствующих положениях во второй аминокислотной последовательности] на [общее число аминокислотных остатков в первой аминокислотной последовательности] и умножения на [100%], где каждая делеция, инсерция, замена или добавление аминокислотного остатка во второй аминокислотной последовательности, сравниваемой с первой аминокислотной последовательностью, рассматриваются как различие в одном аминокислотном остатке (положении), т.е. как "различие аминокислот", определяемое в настоящей заявке; либо такой процент может быть вычислен с использованием подходящего компьютерного алгоритма или метода. Для определения процента "идентичности" двух аминокислотных последовательностей в соответствии с описанным выше методом вычисления аминокислотную последовательность с наибольшим числом аминокислотных остатков обозначают как "первую" аминокислотную последовательность, а другую аминокислотную последовательность обозначают как "вторую" аминокислотную последовательность.

Кроме того, для определения степени идентичности двух аминокислотных последовательностей специалисту в данной области следует принять во внимание так называемые "консервативные" аминокислотные замены, описанные ниже в пункте v).

Все аминокислотные замены могут быть также введены в описанные в настоящем документе полипептиды, исходя из анализа частоты аминокислотных различий между гомологичными белками, происходящими от различных видов, где указанный анализ был разработан Schulz et al., *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, 1978, исходя из анализа структурообразующих потенциалов, разработанного Chou & Fasman, *Biochemistry* 13: 211, 1974 and *Adv. Enzymol.*, 47: 45-149, 1978, и анализа профилей гидрофобности белков, разработанного Eisenberg et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 140-144, 1984; Kyte & Doolittle; *J. Molec. Biol.* 157: 105-132, 1981, и Goldman et al., *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 15: 321-353, 1986; все указанные публикации во всей своей полноте вводятся в настоящее описание в качестве ссылки. Что касается первичной и вторичной структуры нанотел, то кристаллическая структура V_{HH} -домена ламы описана, например, в публикациях Desmyter et al., *Nature Structural Biology*, Vol. 3, 9, 803 (1996); Spinelli et al., *Natural Structural Biology* (1996); 3, 752-757; и Decanniere et al., *Structure*, Vol. 7, 4, 361 (1999).

h) Термин "различие аминокислот", если он используется при сравнении двух аминокислотных последовательностей, означает инсерцию, делецию или замену одного аминокислотного остатка в положении первой последовательности, сравниваемой со второй последовательностью, и в этом случае подра-

зумеваются, что две аминокислотные последовательности могут иметь различия в одной, двух или более указанных аминокислот.

и) Если говорят, что нуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность "содержит" другую нуклеотидную последовательность или аминокислотную последовательность, соответственно, или "по существу, состоит" из другой нуклеотидной последовательности или аминокислотной последовательности, то это может означать, что последняя нуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность включена в первую упомянутую нуклеотидную последовательность или аминокислотную последовательность, соответственно, но обычно, это означает, что первая упомянутая нуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность содержит фрагмент из нуклеотидов или аминокислотных остатков, соответственно, который имеет ту же самую нуклеотидную последовательность или аминокислотную последовательность, соответственно, как и последняя последовательность, независимо от способа получения или получения первой упомянутой последовательности (где указанным способом может быть, например, любой подходящий описанный в настоящем документе способ). В качестве неограничивающего примера можно сказать, что если один вариабельный домен бипаратопного иммуноглобулина, например, нанотела по изобретению содержит последовательность CDR, то это может означать, что указанная последовательность CDR включена в бипаратопное нанотело по изобретению, но обычно, это означает, что бипаратопное нанотело по изобретению содержит фрагмент из аминокислотных остатков, который имеет такую же аминокислотную последовательность, как и указанная последовательность CDR, независимо от способа продуцирования или получения указанного бипаратопного нанотела. Следует также отметить, что если последняя аминокислотная последовательность имеет конкретную биологическую или структурную функцию, то предпочтительно, чтобы эта функция была, по существу, идентична, аналогична или эквивалентна биологической или структурной функции первой упомянутой аминокислотной последовательности (другими словами, предпочтительно, чтобы первая упомянутая аминокислотная последовательность, так же как и последняя последовательность, обладала способностью осуществлять, в основном, ту же самую, аналогичную или эквивалентную биологическую или структурную функцию). Так, например, если говорят, что бипаратопное нанотело по изобретению содержит последовательность CDR или каркасную последовательность, соответственно, то это означает, что CDR-последовательность и каркасная последовательность, содержащаяся в указанном бипаратопном нанотеле, предпочтительно способна функционировать так же, как и последовательность CDR или каркасная последовательность соответственно. Кроме того, если говорят, что нуклеотидная последовательность содержит другую нуклеотидную последовательность, то это означает, что первая из упомянутых нуклеотидных последовательностей является предпочтительно такой, что, если она экспрессируется с образованием продукта экспрессии (например, полипептида), то аминокислотная последовательность, кодируемая последней нуклеотидной последовательностью, образует часть указанного продукта экспрессии (другими словами, это означает, что последняя нуклеотидная последовательность находится в одной рамке считывания с первой упомянутой более крупной нуклеотидной последовательностью).

ж) Считается, что последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность присутствует "в основном в выделенной форме", например, по сравнению с ее нативным биологическим источником и/или реакционной средой, или культуральной средой, из которой она была выделена, если она была выделена по меньшей мере из одного другого компонента, с которым эта последовательность обычно связана в указанном источнике или в среде, такими как другая нуклеиновая кислота, другой белок/полипептид, другой биологический компонент, или макромолекула, или по меньшей мере одно контаминирующее вещество, примесь или небольшой компонент. В частности, последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность считается "в основном выделенной", если степень ее чистоты выше по меньшей мере в 2 раза, в частности по меньшей мере в 10 раз, более конкретно по меньшей мере в 100 раз и до 1000 раз или более. Последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, которая присутствует "в основном в выделенной форме", предпочтительно является, по существу, гомогенной, как было определено с применением подходящего метода, такого как подходящий хроматографический метод, например электрофорез в полиакриламидном геле.

к) Используемый в настоящем документе термин "антигенсвязывающий домен" означает аминокислотную последовательность иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере одну CDR и имеющую конформацию, распознающую мишень, а именно антигенную детерминанту или эпитоп.

л) Используемые в настоящем документе термины "антигенная детерминанта" и "эпитоп", которые могут быть синонимами, означают аминокислотную последовательность в CXCR2-мишени, которая распознается антигенсвязывающими доменами, независимо от того, имеет ли такая аминокислотная последовательность линейную или нелинейную конформацию.

м) Полипептид по изобретению, такой как, например, описанное в настоящем документе бипаратопное нанотело или его фрагмент, которые могут (специфически) связываться, аффинно связываться и/или специфически связываться со специфической антигенной детерминантой, специфическим эпитопом, антигеном или белком (или по меньшей мере с одной его частью, фрагментом или эпитопом), рас-

считается как полипептид, направленный "против" или направленный "непосредственно против" указанной антигенной детерминанты, указанного эпитопа, антигена или белка.

п) Термин "специфичность" означает число антигенов или антигенных детерминант различных типов, с которыми может связываться конкретный антигенсвязывающий домен полипептида по изобретению. Специфичность антигенсвязывающего белка к любому конкретному антигену/эпитопу может быть определена исходя из аффинности и/или avidности, как указано на стр. 53-56 заявки WO 08/020079 (которая включена в настоящее описание в качестве ссылки), в которой также описаны некоторые предпочтительные методы определения уровня связывания полипептида с соответствующим антигеном или эпитопом. Обычно, в каждом антигенсвязывающем белке (таком как полипептиды по изобретению), каждый антигенсвязывающий домен может независимо связываться со своим антигеном/эпитопом с константой диссоциации (K_D), составляющей 10^{-5} - 10^{-12} моль/л или менее, предпочтительно 10^{-7} - 10^{-12} моль/л или менее, а более предпочтительно 10^{-8} - 10^{-12} моль/л (т.е. с константой ассоциации (K_A) 10^5 - 10^{12} л/моль или более, предпочтительно 10^7 - 10^{12} л/моль или более, более предпочтительно 10^8 - 10^{12} л/моль). Любая величина K_D , составляющая более чем 10^4 моль/л (или любая величина K_A менее чем 10^4 М⁻¹ л/моль), по существу, рассматривается как величина, указывающая на неспецифическое связывание. Предпочтительно бипаратопный полипептид по изобретению связывается с нужным антигеном с аффинностью менее чем 500 нМ, предпочтительно менее чем 200 нМ, более предпочтительно менее чем 10 нМ, например, менее чем 500 пМ. Специфическое связывание полипептида по изобретению с CXCR2 может быть определено любым подходящим методом, известным *per se*, включая, например, анализ Скэтчарда и/или анализы на конкурентное связывание, такие как радиоиммуноанализы (РИА), ферментные иммуноанализы (EIA) и "сэндвич"-анализы на конкурентное связывание, и их различные варианты, известные специалистам *per se*, а также другие упомянутые в настоящем документе методы. Как очевидно для специалиста и как указано на стр. 53-56 заявки WO 08/020079, константой диссоциации может быть фактическая или кажущаяся константа диссоциации. Методы определения константы диссоциации известны специалистам и включают, например, методы, описанные на стр. 53-56 заявки WO 08/020079.

о) Время полужизни полипептида по изобретению, в частности бипаратопного нанотела по изобретению, может быть, в основном, определено как время, за которое концентрация полипептида по изобретению в сыворотке снижается на 50% *in vivo*, например, в результате разложения полипептида и/или клиренса или секвестрации полипептида под действием природных механизмов. Время полужизни полипептида по изобретению *in vivo* может быть определено любым известным способом *per se*, таким как фармакокинетический анализ. Подходящие методы известны специалистам и, по существу, описаны, например, в параграфе о) на стр. 57 заявки WO 08/020079. Как упоминается на стр. 57 заявки WO 08/020079, время полужизни может быть выражено такими параметрами, как $t_{1/2-\alpha}$, $t_{1/2-\beta}$ и площадь под кривой (AUC). Ниже приводится ссылка на экспериментальную часть, а также на стандартные руководства, такие как Kenneth, A. et al. *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and Peters et al., Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach* (1996). Также приводится ссылка на руководство "Pharmacokinetics", M. Gibaldi & D. Perron, опубликованное Marcel Dekker, 2nd Rev. edition (1982). Термины "увеличение времени полужизни" или "увеличенное время полужизни" относятся к увеличению $t_{1/2-\beta}$ с увеличением или без увеличения $t_{1/2-\alpha}$, и/или AUC, или того и другого.

р) В контексте настоящего изобретения термины "блокирование, снижение или ингибирование" активности CXCR2, определяемой с помощью подходящих анализов *in vitro*, клеточных анализов или анализов *in vivo*, может означать либо блокирование, либо снижение, либо ингибирование релевантной или предполагаемой биологической активности CXCR2 по меньшей мере на 1%, предпочтительно по меньшей мере на 5%, например, по меньшей мере на 10% или по меньшей мере на 25%, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или на 90% или более по сравнению с активностью CXCR2 в том же самом анализе и в тех же самых условиях, но в отсутствие полипептида по изобретению.

Как очевидно для специалиста в данной области, термин "ингибирование" может также включать снижение аффинности, avidности, специфичности и/или селективности CXCR2 по отношению к одному или нескольким его лигандам или партнерам по связыванию и/или снижение чувствительности CXCR2 для одного или нескольких условий в среде, или в окружении, в котором присутствует CXCR2 (таких как pH, ионная сила, присутствие кофакторов и т.п.), по сравнению с теми же самыми условиями, но в отсутствие полипептида по изобретению. Как очевидно для специалиста в данной области, такое ингибирование может быть также определено любым подходящим методом и/или с помощью любого подходящего анализа, известного *per se*, в зависимости от рассматриваемой мишени или рассматриваемого антигена.

q) Используемый в настоящем документе термин "модуляция" может означать аллостерическую модуляцию CXCR2; и/или снижение уровня связывания или ингибирование связывания CXCR2 с одним из его лигандов, и/или конкурирование с природным лигандом за связывание с CXCR2. Модуляция может также, например, включать изменение укладки или конформации CXCR2, или сообщение способности CXCR2 изменять свою конформацию (например, после связывания с лигандом) для связывания с другими единицами (субъединицами) или для диссоциации от этих единиц (субъединиц). Модуляция

может также включать, например, изменение способности CXCR2 транспортировать другие соединения или служить в качестве канала для других соединений (таких как ионы).

Модуляция, в частности ингибирование или снижение активности CXCR2 под действием полипептидов по изобретению, а именно бипаратопных нанотел по изобретению, может быть обратимой или необратимой, однако для их использования в фармацевтике и в фармакологии желательно, чтобы такое ингибирование или снижение активности CXCR2 было обратимым.

г) Полипептид по изобретению считается "специфичным" по отношению к CXCR2 по сравнению со второй мишенью или антигеном, если он связывается с CXCR2 с аффинностью (описанной выше и выражаемой как величина K_D , величина K_A , константа скорости диссоциации K_{off} и/или константа скорости ассоциации K_{on}), которая по меньшей мере в 10 раз, например по меньшей мере в 100 раз, предпочтительно по меньшей мере в 1000 раз и до 10000 раз или более превышает аффинность связывания со второй мишенью или полипептидом. Так, например, полипептид по изобретению может связываться с CXCR2 с величиной K_D , которая по меньшей мере в 10 раз, например по меньшей мере в 100 раз, предпочтительно по меньшей мере в 1000 раз, например в 10000 раз или т.п. меньше величины K_D для связывания с другой мишенью или с другим полипептидом или эпитопом.

с) Используемые в настоящем описании термины "перекрестно блокировать", "перекрестно блокированный" и "перекрестное блокирование" являются синонимами и относятся к способности одного переменного домена иммуноглобулина или полипептида негативно влиять на связывание других отдельных переменных доменов иммуноглобулина или полипептидов по изобретению с данной мишенью. Степень влияния одного переменного домена иммуноглобулина или полипептида по изобретению на связывание с другой мишенью, которое можно назвать перекрестным блокированием по изобретению, может быть определена с помощью анализов на конкурентное связывание. В одном особенно подходящем количественном анализе на перекрестное блокирование применяется FACS- или ELISA-метод оценки конкурентного связывания меченного (например, His-меченного, радиоактивно меченного или флуоресцентно меченного) одного переменного домена иммуноглобулина или полипептида по изобретению и другого связывающего агента с мишенью. В экспериментальной части, по существу, описан подходящий анализ на основе FACS и ELISA с замещением, проводимый для того, чтобы определить, может ли связывающая молекула перекрестно блокировать один переменный домен иммуноглобулина или полипептид по изобретению, или она перекрестно блокирует такой домен или полипептид. Следует отметить, что в этом анализе могут быть использованы любые описанные в настоящем документе отдельные переменные домены иммуноглобулина или другие связывающие агенты. Таким образом, в основном, перекрестно блокирующая аминокислотная последовательность или другой связывающий агент по изобретению представляют собой последовательность или агент, которые будут связываться с мишенью в вышеуказанном анализе на перекрестное блокирование так, чтобы во время проведения анализа и в присутствии второй аминокислотной последовательности или другого связывающего агента по изобретению зарегистрированное замещение одного переменного домена иммуноглобулина или полипептида по изобретению составляло 50-100% от максимального теоретического замещения под действием предполагаемого тестируемого перекрестно блокирующего агента (например, другого фрагмента антитела, V_{Hn} , dAb или аналогичного варианта V_H/V_L).

т) Считается, что полипептид по изобретению "перекрестно реагирует" с двумя различными антигенами или с антигенными детерминантами (такими как сывороточный альбумин или CXCR2 от млекопитающих двух различных видов, таких как человек и собакоподобная обезьяна), если он является специфичным (как определено в настоящем описании) по отношению к этим различным антигенам или антигенным детерминантам.

и) Определенный в настоящем описании термин "консервативные аминокислотные замены" означает аминокислотные замены, при которых один аминокислотный остаток заменяют другим аминокислотным остатком, который имеет аналогичную химическую структуру, и который оказывает незначительное влияние или, по существу, не оказывает какого-либо влияния на функцию, активность или другие биологические свойства указанного полипептида. Такие консервативные аминокислотные замены хорошо известны специалистам и описаны, например, в WO 04/037999, GB-A-3357768, WO 98/49185, WO 00/46383 и WO 01/09300; и (предпочтительные) типы и/или комбинации таких замен могут быть выбраны исходя из соответствующего описания в заявке WO 04/037999, а также в заявке WO 98/49185 и в других работах, цитируемых в этих заявках.

Такими консервативными заменами предпочтительно являются замены, где одна аминокислота, входящая в нижеследующие группы (а)-(е), заменена другим аминокислотным остатком, принадлежащим к той же самой группе, где указанными группами являются: (а) небольшие алифатические неполярные или слабополярные остатки Ala, Ser, Thr, Pro и Gly; (б) полярные отрицательно заряженные остатки и их (незаряженные) амиды Asp, Asn, Glu и Gln; (с) полярные, положительно заряженные остатки His, Arg и Lys; (д) крупные алифатические неполярные остатки Met, Leu, Ile, Val и Cys; и (е) ароматические остатки Phe, Tyr и Trp.

Особенно предпочтительными консервативными заменами являются следующие замены: Ala на Gly или на Ser; Arg на Lys; Asn на Gln или на His; Asp на Glu; Cys на Ser; Gln на Asn; Glu на Asp; Gly на Ala

или на Pro; His на Asn или на Gln; Ile на Leu или на Val; Leu на Ile или на Val; Lys на Arg, на Gln или на Glu; Met на Leu, на Tyr или на Ile; Phe на Met, на Leu или на Tyr; Ser на Thr; Thr на Ser; Trp на Tyr; Tyr на Trp; и/или Phe на Val, на He или на Leu.

v) Как используется в настоящем описании, CDR представляет собой гипервариабельную область полипептидов по изобретению. CDR представляет собой фрагмент из аминокислот, которые, если они присутствуют отдельно или в комбинации с одной или несколькими другими CDR, определяют комплементарность с антигеном(ами) или эпитопом(ами), которые распознает полипептид по изобретению. CDR идентифицируют в аминокислотных последовательностях в соответствии с определенными соглашениями о нумерации. В формуле изобретения и в конкретном описании настоящей заявки используется нумерация Kabat.

w) Используемый в настоящем документе термин "FR" означает каркасную область (иногда обозначаемую FW). Каркасные области представляют собой аминокислотные фрагменты, которые фланкируют одну или несколько CDR и сохраняют их правильную трехмерную конформацию, необходимую для распознавания антигена или эпитопа. FR не обладают специфичностью к антигену или к эпитопу мишени, но являются специфичными для молекул иммуноглобулина определенного вида или типа, в которых они присутствуют. Как подробно обсуждается ниже, в полипептидах по изобретению аминокислотные последовательности каркасной области должны быть сконструированы так, чтобы они отличались от каркасной последовательности, происходящей от источника иммуноглобулина, например, верблюда.

x) Используемый в настоящем документе термин "CXCR2" означает цитокиновый рецептор, который присутствует, по меньшей мере, на поверхности лейкоцитов, и природными лигандами которого могут быть GRO- α , β , γ , IL-8, ENA-78 или GCP-2. Используемый в настоящем документе термин "CXCR2", по существу, означает любой белок, обладающий функцией CXCR2, независимо от источника его происхождения. Однако используемый в настоящем описании термин "CXCR2 человека" означает белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, или любой его аллельный вариант или ортолог, а термин "CXCR2 собакоподобных обезьян" означает белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, или любой его аллельный вариант или ортолог.

y) Используемый в настоящем описании термин "оптимизация последовательности" означает подбор наиболее благоприятных замен, инсерций или делеций для введения в аминокислотную последовательность в целях сохранения или сообщения конкретных свойств или структурных особенностей, которые могут отсутствовать в нативной последовательности. Такие замены, инсерций или делеций могут быть введены, например, в целях химической стабилизации, улучшения технологических свойств, предотвращения образования пироглутамата или предотвращения окисления или изомеризации. Методы оптимизации таких свойств, которые могут быть применены для бипаратопных полипептидов, в частности бипаратопных нанотел по изобретению, описаны в заявке WO 2009/095235, которая вводится в настоящее описание посредством ссылки. Методы оптимизации последовательностей могут быть также осуществлены в целях гуманизации бипаратопного полипептида по изобретению описанным в настоящем документе способом. Таким образом, при использовании любого из терминов "оптимизация последовательностей", "оптимизировать последовательность" или "оптимизированная последовательность" подразумевается, что они относятся к конкретным заменам или инсерциям, введенным в целях гуманизации, или к частично или полностью гуманизированным бипаратопным полипептидам, предпочтительно к бипаратопным нанотелам.

Подробное описание изобретения

Как указывалось выше, в первом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере два антигенсвязывающих домена иммуноглобулина, где полипептид направлен против хемокинового рецептора CXCR2 или связывается с этим рецептором, и где указанный полипептид включает первый антигенсвязывающий домен, распознающий первый эпитоп на CXCR2, и второй антигенсвязывающий домен, распознающий второй эпитоп на CXCR2.

Предпочтительный полипептид по изобретению содержит первый антигенсвязывающий домен, способный связываться с линейным пептидом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, и второй антигенсвязывающий домен, который либо не способен связываться с указанным линейным пептидом, либо связывается с этим пептидом с меньшей аффинностью. SEQ ID NO: 7 представляет собой первые 19 N-концевых аминокислот CXCR2 человека.

В одном из вариантов осуществления изобретения первый антигенсвязывающий домен распознает первый эпитоп, содержащий область из 1-19 аминокислот CXCR2 или входящий в эту область, а указанный второй антигенсвязывающий домен распознает второй эпитоп на CXCR2, находящийся за пределами аминокислот 1-19.

Первый и второй антигенсвязывающие домены могут находиться в одной или нескольких аминокислотных последовательностях, характерных для молекулы класса иммуноглобулинов. Так, например, эти пептиды или полипептиды могут содержать стандартное четырехцепочечное антитело, присоединенное посредством линкера. В частности, полипептид по изобретению может представлять собой полипептид, в котором указанные первый и второй антигенсвязывающие домены присутствуют в первом и вто-

ром антителах соответственно, каждое из которых содержит две тяжелых и две легких цепи, где указанные первое и второе антитела связаны посредством линкера. Альтернативно, указанные первый и второй антигенсвязывающие домены могут находиться в одном антителе, содержащем две тяжелых и две легких цепи.

В альтернативном варианте осуществления изобретения первый и второй антигенсвязывающие домены содержатся в аминокислотных последовательностях, которые представляют собой антитела с тяжелой цепью, в частности, полипептидом по изобретению может быть полипептид, в котором указанный первый антигенсвязывающий домен содержится в первом антителе с тяжелой цепью, а указанный второй антигенсвязывающий домен находится во втором антителе с тяжелой цепью, где указанные первое и второе антитела с тяжелой цепью связаны посредством линкера. Такие антитела с тяжелой цепью могут происходить от животных семейства верблюжьих и содержат по своей природе только две тяжелых цепи, каждая из которых содержит константную и переменную область. В настоящем изобретении также рассматривается полипептид, в котором указанные первый и второй связывающие домены присутствуют в одном антителе с тяжелой цепью, содержащем две тяжелые цепи.

В другом альтернативном варианте осуществления изобретения пептиды или полипептиды, содержащие первый и второй связывающие домены, могут представлять собой одноцепочечный Fv (scFv). Эти пептиды или полипептиды содержат линейные слитые V_L - и V_H -домены. В соответствии с этим полипептидом по изобретению может быть полипептид, где первый и второй антигенсвязывающие домены присутствуют в первом и втором одноцепочечных Fv-фрагментах (scFv) антитела, соответственно, и где указанные первый и второй scFv-фрагменты связаны посредством линкера.

В другом альтернативном варианте осуществления изобретения первый и второй антигенсвязывающие домены могут содержаться в одном или нескольких Fab или $F(ab)_2$ -фрагментах стандартного четырехцепочечного антитела. Fab-фрагмент содержит один константный домен и один переменный домен, происходящий от каждой одной тяжелой и одной легкой цепи стандартного антитела. $F(ab)_2$ -фрагмент содержит два Fab-фрагмента, связанных частью шарнирной области стандартного антитела. В частности, полипептидом по изобретению может быть полипептид, где указанные первый и второй антигенсвязывающие домены присутствуют в первом и втором Fab- или $F(ab)_2$ -фрагментах антитела соответственно, и где указанные первый и второй Fab-или $F(ab)_2$ -фрагменты связаны посредством линкера. В таком варианте изобретения указанный первый антигенсвязывающий домен может содержаться в Fab-фрагменте антитела, а указанный второй антигенсвязывающий домен содержится в $F(ab)_2$ -фрагменте или наоборот.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения первый антигенсвязывающий домен содержится в одном переменном домене первого иммуноглобулина, а указанный второй антигенсвязывающий домен содержится в одном переменном домене второго иммуноглобулина.

В конкретном примере этого варианта осуществления изобретения первый и второй антигенсвязывающие домены содержатся в однодоменном антителе, обозначаемом d(ab). Антитела d(ab) содержат один V_L -домен или один V_H -домен, происходящий от стандартных антител. Таким образом, полипептидом по изобретению может быть полипептид, где указанные первый и второй антигенсвязывающие домены содержатся в первом и втором доменных антителах (dAb), и где указанные первое и второе dAb связаны посредством линкера. Указанные первое и второе dAb могут представлять собой V_L -фрагменты или V_H -фрагменты антитела. В настоящем варианте осуществления изобретения указанный первый антигенсвязывающий домен может содержаться в V_L -фрагменте, а указанный второй антигенсвязывающий домен может содержаться в V_H -фрагменте, или наоборот.

Общее описание (одно)доменных антител можно также найти в EP 0368684. Определение термина "dAb" можно найти в публикации Ward et al. (Nature 1989 Oct 12; 341 (6242): 544-6), Holt et al., Trends Biotechnol., 2003, 21(11):484-490; а также, например, в заявках WO 06/030220, WO 06/003388 и в других опубликованных патентных заявках Domantis Ltd. Следует также отметить, что хотя однодоменные антитела или отдельные переменные домены могут быть получены от акул некоторых видов (например, так называемые "домены IgNAR", см., например, WO 05/18629), однако с точки зрения настоящего изобретения они являются менее предпочтительными, поскольку они не происходят от млекопитающих.

Переменная область одной цепи такого антитела с тяжелой цепью известна как V_{HH} -домен и содержит фрагмент антитела, известный как нанотело. Нанотело может содержать весь V_{HH} -домен или его фрагмент. Общее описание антител с тяжелой цепью и их переменных доменов можно найти в предшествующей заявке WO 08/020079 на стр. 59 и списке работ, опубликованных на стр. 41-43 международной заявки WO 06/040153. V_{HH} -домены имеют ряд уникальных структурных особенностей и функциональных свойств, которые позволяют получить выделенные V_{HH} -домены (а также нанотела на их основе, имеющие структурные и функциональные свойства, аналогичные структурным и функциональным свойствам природных V_{HH} -доменов), и полипептиды, имеющие такие же в высокой степени предпочтительные свойства, как и функциональные антигенсвязывающие домены или полипептиды. В частности, V_{HH} -домены (которые были "сконструированы") в соответствии с их природной способностью функционально связываться с антигеном в отсутствие переменной области легкой цепи или без какого-либо взаимодействия с этим доменом), и нанотела могут функционировать как одна относительно небольшая функ-

циональная антигенсвязывающая структурная единица, домен или белок. Используемый в настоящем документе термин "нанотело" охватывает не только природные $V_{\text{H}}-\text{домены}$ и их фрагменты, но также и их варианты и производные, подробно обсуждаемые ниже.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения бипаратопным полипептидом по изобретению является полипептид, где указанный первый антигенсвязывающий домен содержится в первом нанотеле, а указанный второй антигенсвязывающий домен присутствует во втором нанотеле, и где указанные первое и второе нанотела связаны посредством линкера.

Структура $V_{\text{H}}-\text{домена}$ может быть представлена как
FR-CDR-FR-CDR-FR-CDR-FR,

а бипаратопный полипептид по изобретению может иметь одну из нижеследующих структур:

- i) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,
- ii) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8-линкер-HLE,
- iii) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-HLE-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

где если FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 содержит первый антигенсвязывающий домен (связывающийся с линейной SEQ ID NO: 7), то FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 содержит второй антигенсвязывающий домен (не связывающийся с линейной SEQ ID NO: 7), а если FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 содержит второй антигенсвязывающий домен (не связывающийся с линейной SEQ ID NO: 7), то FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 содержит первый антигенсвязывающий домен (связывающийся с линейной SEQ ID NO: 7), а HLE представляет собой связывающую единицу, способствующую увеличению времени полужизни *in vivo*.

В соответствии с этим используемый в настоящем документе термин "бипаратопное нанотело по изобретению" означает полипептид, содержащий два отдельных нанотела, связанных посредством линкера.

Однако бипаратопные нанотела по изобретению могут содержать лишь одну CDR в каждом нанотеле. Если это имеет место, то предпочтительной CDR является CDR3 и/или CDR6. Однако бипаратопные нанотела по изобретению могут представлять собой CDR1, или CDR2, или CDR3, или CDR1 и CDR2, или CDR1 и CDR3, или CDR2 и CDR3, или CDR1 и CDR2 и CDR3 в N-концевом нанотеле и любую из нижеследующих комбинаций в C-концевом нанотеле: CDR4, или CDR5, или CDR6, или CDR4 и CDR5, или CDR4 и CDR6, или CDR5 и CDR6, или CDR4 и CDR5 и CDR6. Как указывалось выше, бипаратопное нанотело по изобретению может содержать все CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 и CDR6, где каждая CDR фланкирована FR.

FR могут иметь аминокислотные последовательности, соответствующие исходной верблюжьей последовательности. Однако в предпочтительных вариантах осуществления изобретения одна или несколько FR имеют по меньшей мере одну последовательность-оптимизирующую аминокислотную замену, при этом предпочтительно, чтобы одна или несколько, предпочтительно все, FR были частично или полностью гуманизированными. Замены для оптимизации последовательности более подробно обсуждаются ниже.

Также указывалось, что в вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых первый и второй антигенсвязывающие домены находятся в отдельных переменных доменах первого и второго иммуноглобулина, не являющихся нанотелами, и в доменах или фрагментах стандартных антител, обсуждаемых выше, например человеческих антител, доменов или фрагментов, область CDR может быть модифицирована путем введения в нее по меньшей мере одной замены верблюжьим остатком и продуцировать, но необязательно, полностью верблюжьим CDR.

Как описано в настоящей заявке, общее число аминокислотных остатков в одном нанотеле может составлять в пределах 110-120 остатков, предпочтительно 112-115 остатков, наиболее предпочтительно 113 остатков. Однако следует отметить, что части, фрагменты, аналоги или производные (как подробно описано ниже) нанотела не имеют конкретных ограничений по их длине и/или размеру при условии, что такие части, фрагменты, аналоги или производные будут удовлетворять указанным в настоящем документе требованиям и могут также оказаться предпочтительными для достижения описанных в настоящем документе целей.

Как описано в настоящей заявке, аминокислотные остатки нанотела пронумерованы в соответствии с общей системой нумерации $V_{\text{H}}-\text{доменов}$, предложенной Kabat и др. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication NO:91) и применяемой к верблюжьим $V_{\text{H}}-\text{доменам}$, описанным в статье Riechmann and Muyldermans, J. Immunol. Methods 2000 Jun 23; 240 (1-2): 185-195 (см., например, фиг. 2 этой публикации), и соответственно, FR1 нанотела может содержать аминокислотные остатки в положениях 1-30; CDR1 нанотела может содержать аминокислотные остатки в положениях 31-35; FR2 нанотела может содержать аминокислотные остатки в положениях 36-49; CDR2 нанотела может содержать аминокислотные остатки в положениях 50-65; FR3 нанотела может содержать аминокислотные остатки в положениях 66-94; CDR3 нанотела может содержать аминокислотные остатки в положениях 95-102; и FR4 нанотела может содержать аминокислотные остатки в положе-

доменов антител, см., например, WO 04/081026.

Таким образом, в другом своем аспекте настоящее изобретение относится к молекуле, содержащей по меньшей мере два полипептида, где молекула направлена против хемокинового рецептора CXCR2 или связывается с этим рецептором, и где первый полипептид содержит первый антигенсвязывающий домен иммуноглобулина, а второй полипептид содержит второй антигенсвязывающий домен иммуноглобулина, где указанные первый и второй антигенсвязывающие домены распознают первый и второй эпитопы на CXCR2, и где указанные по меньшей мере два полипептида связаны посредством пептидного линкера.

Предпочтительно в одном из аспектов осуществления изобретения первый антигенсвязывающий домен способен связываться с линейным пептидом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, а указанный второй антигенсвязывающий домен либо не связывается с указанным линейным пептидом, либо связывается с этим пептидом с меньшей аффинностью. Предпочтительно первый эпитоп содержит аминокислоты 1-19 CXCR2 или входит в указанную область аминокислот, а второй эпитоп находится за пределами аминокислот 1-19 CXCR2.

Предпочтительно в этом аспекте осуществления изобретения первый и второй антигенсвязывающие домены содержатся в отдельных варибельных доменах иммуноглобулина, где указанные первый и второй отдельные варибельные домены иммуноглобулина предпочтительно представляют собой нанотела, в частности любое из нанотел, конкретно описанных в настоящей заявке.

Во всех описанных в настоящем документе аспектах изобретения важными свойствами линкера являются его длина и конформация, позволяющие первому и второму антигенсвязывающим доменам связываться с их соответствующими эпитопами на CXCR2.

Используемый(е) линкер(ы) может(могут) также сообщать полипептидам по изобретению одно или несколько других благоприятных свойств или функций, и/или вводить один или несколько сайтов для образования производных, и/или для присоединения функциональных групп (например, как описано в настоящей заявке для производных бипаратопных нанотел по изобретению). Так, например, линкеры, содержащие один или несколько заряженных аминокислотных остатков (см. табл. А-2 на стр. 48 международной заявки WO 08/020079), могут сообщать улучшенные гидрофильные свойства, а линкеры, которые образуют или содержат небольшие эпитопы или метки, могут быть использованы для детектирования, идентификации и/или очистки. И в этом случае, исходя из описания настоящей заявки, специалист может самостоятельно выбрать оптимальные линкеры, подходящие для использования в конкретном полипептиде по изобретению, после проведения, но необязательно, небольшого числа нетрудоемких рутинных экспериментов.

И наконец, если в полипептидах по изобретению используются два или более линкеров, то эти линкеры могут быть одинаковыми или различными. И в этом случае, исходя из описания настоящей заявки, специалист может самостоятельно выбрать оптимальные линкеры, подходящие для использования в конкретном полипептиде по изобретению, после проведения, но необязательно, небольшого числа нетрудоемких рутинных экспериментов.

Обычно для облегчения экспрессии и получения в настоящем изобретении используется линейный полипептид. Однако в самом широком смысле настоящее изобретение не ограничивается таким полипептидом. Так, например, если полипептид по изобретению содержит три или более нанотел, то они могут быть связаны посредством линкера, имеющего три или более "ветви", где каждая ветвь связана с нанотелом и образует конструкцию в форме "звезды". Такая конструкция также может быть использована, хотя, обычно, она является менее предпочтительной, чем кольцевая конструкция.

В частности, может быть получена любая структура, состоящая из двух или более нанотел с одним или несколькими линкерами, идентифицированными выше. Так, например, может быть рассмотрено бипаратопное биспецифическое нанотело, содержащее два связывающих домена иммуноглобулина, направленных против CXCR2 или связывающихся с ним, и один или несколько связывающих доменов иммуноглобулина, направленных против альбумина сыворотки человека (HSA) или связывающихся с ним, где указанный HSA-связывающий домен может присутствовать вместе с нанотелом, которое присоединено к CXCR2-связывающим нанотелам в любом положении, например между двумя CXCR2-связывающими нанотелами, посредством линкеров, определенных выше.

Авторами настоящей заявки были получены бипаратопные полипептиды в соответствии с настоящим изобретением. Аминокислотные последовательности мультивалентных и бипаратопных анти-CXCR2 нанотел представлены в табл. 13 в разделе "Примеры". Из этих полипептидов особенно предпочтительными полипептидами по изобретению являются бипаратопные нанотела, представленные в табл. 13 как 163D2-127D1, 163E3-127D1, 163E3-54B12, 163D2-54B12, 2B2-163E3, 2B2-163D2, 97A9-2B2, 97A9-54B12, 127D1-163D2, 127D1-163E3, 2B2-97A9, 54B12-163D2, 54B12-163E3, 163D2-2B2 и 163E3-2B2, а также 127D1-97A9, 54B12-97A9 и 97A9-127D1 и их варианты с оптимизированной последовательностью. Все указанные бипаратопные нанотела содержат первое нанотело, содержащее первый антигенсвязывающий домен, способный связываться с линейным пептидом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 (аминокислоты 1-19 CXCR2), и второе нанотело, содержащее второй антигенсвязывающий домен, который либо не связывается с указанным линейным пептидом, либо связывается с

этим пептидом с меньшей аффинностью (см. табл. 8). Особенно предпочтительными полипептидами по изобретению являются 163D2-127D1, 163E3-127D1, 163E3-54B12, 163D2-54B12, 2B2-163E3, 2B2-163D2, 97A9-2B2 и 97A9-54B12.

1) 163D2-127D1 (SEQ ID NO: 58).

Этот вариант осуществления изобретения относится к бипаратопному нанотелу, где указанное второе нанотело, определенное выше, содержит по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 145, 165 и 185, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 145, 165 или 185, и где указанное первое нанотело включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 141, 161 и 181, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 141, 161 или 181.

Бипаратопное нанотело предпочтительно имеет структуру

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

где в указанном втором нанотеле CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 185, и где в указанном первом нанотеле CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181, или где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любой одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 145, 165, 185, 141, 161 или 181.

Аминокислотные последовательности могут отличаться от последовательностей, представленных в любой из SEQ ID NO: 145, 165, 185, 141, 161 или 181, только консервативными аминокислотными заменами. Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых указанных выше последовательностей ID только одной, двумя или тремя аминокислотами.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего аспекта изобретения FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104, FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124, FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

В альтернативном варианте FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 могут иметь аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любой аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 83, 104, 124, 131, 79, 100 или 120.

Так, например, в этом аспекте осуществления изобретения FR1 и/или FR4 могут содержать любые аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 70-89; FR2 и/или FR5 могут содержать любые аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 91-110; FR3 и/или FR6 могут содержать любые аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 111-130; и FR4 и/или FR8 могут содержать любые аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 131-133.

В особенно предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58.

В другом варианте осуществления настоящего аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 58 или по меньшей мере на 80% идентична каркасным областям, пронумерованным по Kabat, где указанное бипаратопное нанотело может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит, в основном, последовательности CDR, которые представлены в SEQ ID NO: 58, но которые были модифицированы в каркасных областях так, чтобы они включали одну или несколько последовательность-оптимизирующих замен, предпочтительно одну или несколько замен, указанных в табл. 28 для нанотела 163D2 и в табл. 26 для нанотела 127D1. Нанотело 163D2 предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 218, а нанотело 127D1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на

95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 216. Так, например, каркасные области этих нанотел могут иметь последовательность каркасных областей FR1, FR2, FR3 или FR4, пронумерованных по Kabat, и представленных в любой из SEQ ID NO: 213-219 в табл. 32. Предпочтительно такое бипаратопное нанотело с оптимизированной последовательностью может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

2) 163E3-127D1 (SEQ ID NO: 59).

Этот вариант осуществления изобретения относится к бипаратопному нанотелу, где указанное второе нанотело содержит по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146, 166 и 186, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 146, 166 и 186, и где указанное первое нанотело включает по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 141, 161 и 181, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 141, 161 или 181.

Бипаратопное нанотело предпочтительно имеет структуру

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

где в указанном втором нанотеле CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146; CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 166; а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186, и где в указанном первом нанотеле CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141; CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181 или где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любой одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 146, 166, 186, 141, 161 или 181.

Аминокислотные последовательности могут отличаться от последовательностей SEQ ID NO: 146, 166, 186, 141, 161 или 181, только консервативными аминокислотными заменами. Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых указанных выше последовательностей ID только одной, двумя или тремя аминокислотами.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего аспекта изобретения FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105, FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125, FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

В альтернативном варианте FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 могут иметь аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 84, 105, 125, 131, 79, 100 или 120.

Например, в этом аспекте осуществления изобретения FR1 и/или FR4 могут содержать любые аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 70-89; FR2 и/или FR5 могут содержать любые аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 91-110; FR3 и/или FR6 могут содержать любые аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 111-130; и FR4 и/или FR8 могут содержать любые аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 131-133.

В предпочтительном варианте осуществления аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 59.

В одном из вариантов этого аспекта изобретения, бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 59 или по меньшей мере на 80% идентична каркасным областям, пронумерованным по Kabat, где указанное бипаратопное нанотело может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего аспекта изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит, в основном, последовательности CDR, которые представлены в SEQ ID NO: 59, и которые были модифицированы в каркасных областях так, чтобы они включали одну или несколько последовательность-оптимизирующих замен, предпочтительно одну или несколько замен, указанных в табл. 24 для нанотела 163E3, и в табл. 26 для нанотела 127D1. Нанотело 163E3 предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 217, а нанотело 127D1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216, или аминокислотную последова-

тельность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 216. Например, каркасные области этих нанотел могут иметь последовательность каркасных областей FR1, FR2, FR3 или FR4, пронумерованных по Kabat и представленных в любой из SEQ ID NO: 213-219 в табл. 32. Предпочтительно такое бипаратопное нанотело с оптимизированной последовательностью может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

3) 163E3/54B12 (SEQ ID NO: 62).

Этот вариант осуществления изобретения относится к бипаратопному нанотелу, где указанное второе нанотело включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146, 166 и 186, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 146, 166 и 186, и где указанное первое нанотело включает по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 151, 171 и 191, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 151, 171 или 191.

Бипаратопное нанотело предпочтительно имеет структуру

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

где в указанном втором нанотеле CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 166, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186; и где в указанном первом нанотеле CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 171, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191 или где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85% или по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любой одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 146, 166, 186, 151, 171 или 191.

Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых последовательностей из SEQ ID NO: 146, 166, 186, 151, 171, 191 только консервативными аминокислотными заменами.

Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых указанных выше последовательностей ID только одной, двумя или тремя аминокислотами.

В соответствии с этим аспектом изобретения FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105, FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125, FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110, FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

В альтернативном варианте FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 имеют аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любым аминокислотным последовательностям из SEQ ID NO: 84, 105, 125, 131, 89, 110 или 130.

Например, в этом аспекте изобретения FR1 и/или FR4 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 70-89; FR2 и/или FR5 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 91-110; FR3 и/или FR6 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 111-130, и FR4 и/или FR8 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 131-133.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 62.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 62 или по меньшей мере на 80% идентична каркасным областям, пронумерованным по Kabat, где указанное бипаратопное нанотело может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит, в основном, последовательности CDR, которые представлены в SEQ ID NO: 62, и которые были модифицированы в каркасных областях так, чтобы они включали одну или несколько последовательность-оптимизирующих замен, предпочтительно одну или несколько замен, указанных в табл. 24 для нанотела 163E3 и в табл. 30 для нанотела 51B12. Нанотело 163E3 предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 217, а нанотело

54B12 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 219 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 219. Например, каркасные области этих нанотел могут иметь последовательность каркасных областей FR1, FR2, FR3 или FR4, пронумерованных по Kabat и представленных в любой из SEQ ID NO: 212-219 в табл. 32. Предпочтительно такое бипаратопное нанотело с оптимизированной последовательностью может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC_{50} менее чем 20 нМ.

4) 163D2/54B12 (SEQ ID NO: 63).

Этот вариант осуществления изобретения относится к бипаратопному нанотелу, где указанное второе нанотело включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 145, 165 и 185, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 145, 165 и 185, и где указанное первое нанотело включает по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 151, 171 и 191, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 151, 171 или 191.

Бипаратопное нанотело предпочтительно имеет структуру

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

где в указанном первом нанотеле CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 185, и где в указанном втором нанотеле CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 171, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191, или где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любой одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 145, 165, 185, 151, 171 или 191.

Аминокислотные последовательности могут отличаться от любой из последовательностей SEQ ID NO: 145, 165, 185, 151, 171 или 191 только консервативными аминокислотными заменами. Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых указанных выше последовательностей ID только одной, двумя или тремя аминокислотами.

В соответствии с этим аспектом изобретения FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104, FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124, FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110, FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

В альтернативном варианте FRI, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 могут иметь аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 83, 104, 124, 131, 89, 110 или 130.

Например, в этом аспекте изобретения FR1 и/или FR4 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 70-89; FR2 и/или FR5 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 91-110; FR3 и/или FR6 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 111-130, и FR4 и/или FR8 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 131-133.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63.

В одном из предпочтительных вариантов изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 63, или по меньшей мере на 80% идентична каркасным областям, пронумерованным по Kabat, где указанное бипаратопное нанотело может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC_{50} менее чем $2 \cdot 10^{-9}$ М.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит, в основном, последовательности CDR SEQ ID NO: 63, которые были модифицированы в каркасных областях так, чтобы они включали одну или несколько последовательность-оптимизирующих замен, предпочтительно одну или несколько замен, указанных в табл. 28 для нанотела 163D2 и в табл. 30 для нанотела 54B12. Нанотело 163D2 предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%

идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 218, а нанотело 54B12 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 219 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 219. Так, например, каркасные области этих нанотел могут иметь последовательность каркасных областей FR1, FR2, FR3 или FR4, пронумерованных по Kabat и представленных в любой из SEQ ID NO: 213-219 в табл. 32. Предпочтительно такое бипаратопное нанотело с оптимизированной последовательностью может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

5) 2B2/163E3 (SEQ ID NO: 64).

Этот вариант осуществления изобретения относится к бипаратопному нанотелу, где указанное первое нанотело включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 147, 167 и 187, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 147, 167 и 187, и где указанное второе нанотело включает по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146, 166 и 186, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 146, 166 или 186.

Бипаратопное нанотело предпочтительно имеет структуру

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

где в указанном первом нанотеле CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 167, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 187, и где в указанном втором нанотеле CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 166, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186, или где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любой одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 147, 167, 187, 164, 146 или 186.

Аминокислотные последовательности могут отличаться от последовательностей, представленных в любой из SEQ ID NO: 147, 167, 187, 146, 166 или 186 только консервативными аминокислотными заменами. Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых указанных выше последовательностей ID только одной, двумя или тремя аминокислотами.

В соответствии с этим аспектом изобретения FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126, FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105, FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

В альтернативном варианте FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 имеют аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 85, 106, 126, 131, 84, 105 или 125.

Например, в этом аспекте изобретения FR1 и/или FR4 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 70-89; FR2 и/или FR5 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 91-110; FR3 и/или FR6 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 111-130, и FR4 и/или FR8 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 131-133.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 64.

В одном из предпочтительных вариантов изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 64, или по меньшей мере на 80% идентична каркасным областям, пронумерованным по Kabat, где указанное бипаратопное нанотело может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит, в основном, последовательности CDR, которые представлены в SEQ ID NO: 64 и которые были модифицированы в каркасных областях так, чтобы они включали одну или несколько последовательность-оптимизирующих замен, предпочтительно одну или несколько замен, указанных в табл. 20 для нанотела 2B2 и в табл. 24 для нанотела 163E2. Нанотело 2B2 предпочтительно

содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213 или 214 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 213 или 214, а нанотело 163E3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 217. Так, например, каркасные области этих нанотел могут иметь последовательность каркасных областей FR1, FR2, FR3 или FR4, пронумерованных по Kabat и представленных в любой из SEQ ID NO: 213-219 в табл. 32. Предпочтительно такое бипаратопное нанотело с оптимизированной последовательностью может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

6) 2B2/163D2 (SEQ ID NO: 65).

Этот вариант осуществления изобретения относится к бипаратопному нанотелу, где указанное первое нанотело включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 147, 167 и 187, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 147, 167 или 187, и где указанное второе нанотело включает по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 145, 165 и 185, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 145, 165 или 185.

Бипаратопное нанотело предпочтительно имеет структуру

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

где в указанном первом нанотеле CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 167, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 187, и где в указанном втором нанотеле CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 185, или где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85% или по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любой одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 147, 167, 187, 145, 165 или 185.

Аминокислотные последовательности могут отличаться от последовательностей SEQ ID NO: 147, 167, 187, 145, 165 или 185, только консервативными аминокислотными заменами. Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых указанных выше последовательностей ID только одной, двумя или тремя аминокислотами.

В соответствии с этим аспектом изобретения FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126, FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104, FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

В альтернативном варианте FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 могут иметь аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 85, 106, 126, 131, 83, 104 или 124.

Так, например, в этом аспекте изобретения FR1 и/или FR4 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 70-89; FR2 и/или FR5 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 91-110; FR3 и/или FR6 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 111-130, и FR4 и/или FR8 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 131-133.

Предпочтительное бипаратопное нанотело по изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 65, или по меньшей мере на 80% идентична каркасным областям, пронумерованным по Kabat, где указанное бипаратопное нанотело может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит, в основном, последовательности CDR SEQ ID NO: 65, которые были модифицированы в каркасных областях так, чтобы они включали одну или несколько последовательность-оптимизирующих замен, предпочтительно одну или несколько замен, указанных в табл. 20 для

нанотела 2B2 и в табл. 28 для нанотела 163D2. Нанотело 2B2 предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213 или 214 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 213 или 214, а нанотело 163D2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 218. Так, например, каркасные области этих нанотел могут иметь последовательность каркасных областей FR1, FR2, FR3 или FR4, пронумерованных по Kabat и представленных в любой из SEQ ID NO: 213-219 в табл. 32. Предпочтительно такое бипаратопное нанотело с оптимизированной последовательностью может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

7) 97A9/2B2 (SEQ ID NO: 47).

Этот вариант осуществления изобретения относится к бипаратопному нанотелу, где указанное второе нанотело включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 143, 163 и 183, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 143, 163 или 183, и где указанное первое нанотело включает по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 147, 167 и 187, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 147, 167 или 187.

Бипаратопное нанотело предпочтительно имеет структуру

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

где в указанном втором нанотеле CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143; CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, и где в указанном первом нанотеле, CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147; CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 167, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 187, или где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любой одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 143, 163, 183, 147, 167 или 187.

Аминокислотные последовательности могут отличаться от последовательностей, представленных в любой из SEQ ID NO: 143, 163, 183, 147, 167 или 187, только консервативными аминокислотными заменами. Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых указанных выше последовательностей ID только одной, двумя или тремя аминокислотами.

В соответствии с этим аспектом изобретения FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, FR3 содержит аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 122, FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

В альтернативном варианте FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 имеют аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 81, 102, 122, 133, 85, 106, 126 или 131.

Так, например, в этом аспекте изобретения FR1 и/или FR4 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 70-89; FR2 и/или FR5 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 91-110; FR3 и/или FR6 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 111-130, и FR4 и/или FR8 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 131-133.

Предпочтительно бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47 или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47.

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 47 или по меньшей мере на 80% идентична каркасным областям, пронумерованным по Kabat, где указанное бипаратопное нанотело может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит, в основном, последовательности CDR, которые представлены в SEQ ID NO: 47 и которые были модифицированы в каркасных областях так, чтобы они включали одну или

несколько последовательность-оптимизирующих замен, предпочтительно одну или несколько замен, указанных в табл. 22 для нанотела 97A9 и в табл. 20 для нанотела 2B2. Нанотело 97A9 предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 215, а нанотело 2B2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213 или 214 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 213 или 214. Так, например, каркасные области этих нанотел могут иметь последовательность каркасных областей FR1, FR2, FR3 или FR4, пронумерованных по Kabat и представленных в любой из SEQ ID NO: 213-219 в табл. 32. Предпочтительно такое бипаратопное нанотело с оптимизированной последовательностью может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

8) 97A9/54B12 (SEQ ID NO :61).

Этот вариант осуществления изобретения относится к бипаратопному нанотелу, где указанное второе нанотело включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 143, 163 и 183, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 143, 163 или 183, и где указанное первое нанотело включает по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 151, 171 и 191, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 151, 171 или 191.

Бипаратопное нанотело предпочтительно имеет структуру

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

где в указанном втором нанотеле CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143; CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, и где в указанном первом нанотеле CDR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 151, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 171, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191, или где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любой одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 143, 163, 183, 151, 171 или 191.

Аминокислотные последовательности могут отличаться от последовательностей, представленных в любой из SEQ ID NO: 143, 163, 183, 151, 271 или 191, только консервативными аминокислотными заменами. Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых указанных выше последовательностей ID только одной, двумя или тремя аминокислотами.

В соответствии с этим аспектом изобретения FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81; FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122; FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133; FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110; FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130; и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

В альтернативном варианте FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 имеют аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 81, 102, 122, 133, 89, 110, 130 или 131.

Так, например, в этом аспекте изобретения FR1 и/или FR4 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 70-89; FR2 и/или FR5 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 91-110; FR3 и/или FR6 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 111-130; и FR4 и/или FR8 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 131-133.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 61.

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 61 или по меньшей мере на 80% идентична каркасным областям, пронумерованным по Kabat, где указанное бипаратопное нанотело может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное на-

нотело по изобретению содержит, в основном, последовательности CDR, которые представлены в SEQ ID NO: 61 и которые были модифицированы в каркасных областях так, чтобы они включали одну или несколько последовательность-оптимизирующих замен, предпочтительно одну или несколько замен, указанных в табл. 22 для нанотела 97A9 и в табл. 30 для нанотела 54B12. Нанотело 97A9 предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 215, а нанотело 54B12 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 219 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 219. Так, например, каркасные области этих нанотел могут иметь последовательности каркасных областей FR1, FR2, FR3 или FR4, пронумерованных по Kabat и представленных в любой из SEQ ID NO: 213-219 в табл. 32. Предпочтительно такое бипаратопное нанотело с оптимизированной последовательностью может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

9) 127D1/163D2 (SEQ ID NO: 53).

Этот вариант осуществления изобретения относится к бипаратопному нанотелу, где указанное первое нанотело, определенное выше, включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 141, 161 и 181 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 141, 161 или 181, и где указанное второе нанотело включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 145, 165 и 185, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 145, 165 или 185.

Бипаратопное нанотело предпочтительно имеет структуру

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

где в указанном первом нанотеле CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141; CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161; а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181, и где в указанном втором нанотеле CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145; CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165; а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 185, или где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любой одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 141, 161, 181, 145, 165 или 185.

Аминокислотные последовательности могут отличаться от любой из последовательностей SEQ ID NO: 145, 165, 185, 141, 161 или 181 только консервативными аминокислотными заменами. Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых указанных выше последовательностей ID только одной, двумя или тремя аминокислотами.

В предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79; FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131; FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83; FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104, FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124; и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

В альтернативном варианте FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 могут иметь аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 79, 100, 120, 131, 83, 104 или 124.

Так, например, в этом аспекте изобретения FR1 и/или FR4 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 70-89; FR2 и/или FR5 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 91-110; FR3 и/или FR6 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 111-130, и FR4 и/или FR8 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 131-133.

В особенно предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

В другом варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 53, или по меньшей мере на 80%

идентична каркасным областям, пронумерованным по Kabat, где указанное бипаратопное нанотело может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит, в основном, последовательности CDR, которые представлены в SEQ ID NO: 54 и которые были модифицированы в каркасных областях так, чтобы они включали одну или несколько последовательность-оптимизирующих замен, предпочтительно одну или несколько замен, указанных в табл. 26 для нанотела 127D1 и в табл. 28 для нанотела 163D2. Нанотело 127D1 предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 216, а нанотело 163D2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 218. Так, например, каркасные области этих нанотел могут иметь последовательность каркасных областей FR1, FR2, FR3 или FR4, пронумерованных по Kabat и представленных в любой из SEQ ID NO: 213-219 в табл. 32. Предпочтительно такое бипаратопное нанотело с оптимизированной последовательностью может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

10) 127D1/163E3 (SEQ ID NO: 54).

Этот вариант осуществления изобретения относится к бипаратопному нанотелу, где указанное первое нанотело, определенное выше, включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 141, 161 и 181, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 141, 161 или 181, и где указанное второе нанотело включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146, 166 и 186, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 146, 166 или 186.

Бипаратопное нанотело предпочтительно имеет структуру

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

где в указанном первом нанотеле CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181, и где в указанном втором нанотеле CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 166, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186, или где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любой одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 146, 166, 186, 141, 161 или 181.

Аминокислотные последовательности могут отличаться от последовательностей, представленных в любой из SEQ ID NO: 146, 166, 186, 141, 161 или 181, только консервативными аминокислотными заменами. Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых указанных выше последовательностей ID только одной, двумя или тремя аминокислотами.

В предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105, FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125; и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

В альтернативном варианте FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 могут иметь аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 79, 100, 120, 131, 84, 105 или 125.

Так, например, в этом аспекте изобретения FR1 и/или FR4 могут содержать любые аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 70-89; FR2 и/или FR5 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 91-110; FR3 и/или FR6 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 111-130, и FR4 и/или FR8 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 131-133.

В особенно предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54.

В другом варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 54, или по меньшей мере на 80% идентична каркасным областям, пронумерованным по Kabat, где указанное бипаратопное нанотело может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит, в основном, последовательности CDR, которые представлены в SEQ ID NO: 54 и которые были модифицированы в каркасных областях так, чтобы они включали одну или несколько последовательность-оптимизирующих замен, предпочтительно одну или несколько замен, указанных в табл. 26 для нанотела 127D1 и в табл. 24 для нанотела 163E3. Нанотело 127D1 предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 216, а нанотело 163E3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 217. Так, например, каркасные области этих нанотел могут иметь последовательность каркасных областей FR1, FR2, FR3 или FR4, пронумерованных по Kabat и представленных в любой из SEQ ID NO: 213-219 в табл. 32. Предпочтительно такое бипаратопное нанотело с оптимизированной последовательностью может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

11) 127D1/97A9 (SEQ ID NO: 37 и 39).

Этот вариант осуществления изобретения относится к бипаратопному нанотелу, где указанное первое нанотело, определенное выше, включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 141, 161 и 181, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 141, 161 или 181, и где указанное второе нанотело включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 143, 163 и 183, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 143, 163 или 183.

Бипаратопное нанотело предпочтительно имеет структуру

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

где в указанном первом нанотеле CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181, и где в указанном втором нанотеле CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, или где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85% по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любой одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 141, 161, 181, 143, 163 или 183.

Аминокислотные последовательности могут отличаться от последовательностей, представленных в любой из SEQ ID NO: 141, 161, 181, 143, 163 или 183, только консервативными аминокислотными заменами. Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых указанных выше последовательностей ID только одной, двумя или тремя аминокислотами.

В предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В альтернативном варианте FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 могут иметь аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 79, 100, 120, 131, 81, 102, 122 или 133.

Например, в этом аспекте изобретения FR1 и/или FR4 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 70-89; FR2 и/или FR5 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 91-110; FR3 и/или FR6 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 111-130, и FR4 и/или FR8 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 131-133.

В особенно предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное

нанотело содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и второй антигенсвязывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37 и 39.

В другом варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 и 39 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 37 и 39, или по меньшей мере на 80% идентична каркасным областям, пронумерованным по Kabat, где указанное бипаратопный полипептид может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC_{50} менее чем 20 нМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит, в основном, последовательности CDR, которые представлены в SEQ ID NO: 37 и 39, и которые были модифицированы в каркасных областях так, чтобы они включали одну или несколько последовательность-оптимизирующих замен, предпочтительно одну или несколько замен, указанных в табл. 26 для нанотела 127D1 и в табл. 22 для нанотела 97A9. Нанотело 127D1 предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 216, а нанотело 97A9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 215. Так, например, каркасные области этих нанотел могут иметь последовательность каркасных областей FR1, FR2, FR3 или FR4, пронумерованных по Kabat и представленных в любой из SEQ ID NO: 213-219 в табл. 32. Предпочтительно такое бипаратопное нанотело с оптимизированной последовательностью может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC_{50} менее чем 20 нМ.

12) 2B2/97A9(SEQ ID NO: 46).

Этот вариант осуществления изобретения относится к бипаратопному нанотелу, где указанное первое нанотело, определенное выше, включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 147, 167 и 187, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 147, 167 или 187, и где указанное второе нанотело включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 143, 163 и 183, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 143, 163 или 183.

Бипаратопное нанотело предпочтительно имеет структуру

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

где в указанном первом нанотеле CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 167, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 187, и где в указанном втором нанотеле CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, или где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любой одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 147, 167, 187, 143, 163 или 183.

Аминокислотные последовательности могут отличаться от последовательностей, представленных в любой из SEQ ID NO: 147, 167, 187, 143, 163 или 183, только консервативными аминокислотными заменами. Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых указанных выше последовательностей ID только одной, двумя или тремя аминокислотами.

В предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126, FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В альтернативном варианте FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 могут иметь аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 85, 106, 126, 131, 81, 102, 122 или 133.

Так, например, в этом аспекте изобретения FR1 и/или FR4 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 70-89, FR2 и/или FR5 могут содержать аминокис-

кислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 91-110; FR3 и/или FR6 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 111-130, и FR4 и/или FR8 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 131-133.

В особенно предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46 или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46.

В другом варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 46, или по меньшей мере на 80% идентична каркасным областям, пронумерованным по Kabat, где указанное бипаратопное нанотело может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит, в основном, последовательности CDR, которые представлены в SEQ ID NO: 46 и которые были модифицированы в каркасных областях так, чтобы они включали одну или несколько последовательность-оптимизирующих замен, предпочтительно одну или несколько замен, указанных в табл. 20 для нанотела 2B2 и в табл. 22 для нанотела 97A9. Нанотело 2B2 предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, SEQ ID NO: 213 или 214 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 213 или 214, а нанотело 97A9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 215. Так, например, каркасные области этих нанотел могут иметь последовательность каркасных областей FR1, FR2, FR3 или FR4, пронумерованных по Kabat и представленных в любой из SEQ ID NO: 213-219 в табл. 32. Предпочтительно такое бипаратопное нанотело с оптимизированной последовательностью может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

13) 54B12/163D2 (SEQ ID NO: 69).

Этот вариант осуществления изобретения относится к бипаратопному нанотелу, где указанное первое нанотело, определенное выше, включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 151, 171 и 191, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 151, 171 или 191, и где указанное второе нанотело включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 145, 165 и 185, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 145, 165 или 185.

Бипаратопное нанотело предпочтительно имеет структуру

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

где в указанном первом нанотеле CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 171, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191, и где в указанном втором нанотеле CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 185, или где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любой одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 151, 171, 191, 145, 165 или 185.

Аминокислотные последовательности могут отличаться от последовательностей, представленных в любой из SEQ ID NO: 151, 171, 191, 145, 165 или 185, только консервативными аминокислотными заменами. Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых указанных выше последовательностей ID только одной, двумя или тремя аминокислотами.

В предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110, FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104, FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

В альтернативном варианте FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 могут иметь аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на

90% или по меньшей мере на 95% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 89, 110, 130, 131, 83, 104 или 124.

Например, в этом аспекте изобретения FR1 и/или FR4 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 70-89; FR2 и/или FR5 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 91-110; FR3 и/или FR6 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 111-130, и FR4 и/или FR8 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 131-133.

В особенно предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 69.

В другом варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 69, или по меньшей мере на 80% идентична каркасным областям, пронумерованным по Kabat, где указанное бипаратопное нанотело может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит, в основном, последовательности CDR, которые представлены в SEQ ID NO: 69 и которые были модифицированы в каркасных областях так, чтобы они включали одну или несколько последовательность-оптимизирующих замен, предпочтительно одну или несколько замен, указанных в табл. 30 для нанотела 54B12 и в табл. 28 для нанотела 163D2. Нанотело 54B12 предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 219 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 219, а нанотело 163D2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 218. Например, каркасные области этих нанотел могут иметь последовательность каркасных областей FR1, FR2, FR3 или FR4, пронумерованных по Kabat и представленных в любой из SEQ ID NO: 213-219 в табл. 32. Предпочтительно такое бипаратопное нанотело с оптимизированной последовательностью может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

14) 54B12/163E3 (SEQ ID NO: 68).

Этот вариант осуществления изобретения относится к бипаратопному нанотелу, где указанное первое нанотело, определенное выше, включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 151, 171 и 191, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 151, 171 или 191, и где указанное второе нанотело включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146, 166 и 186, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 146, 166 или 186.

Бипаратопное нанотело предпочтительно имеет структуру

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8.

где в указанном первом нанотеле CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 171, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191, и где в указанном втором нанотеле CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 166, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186, или где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любой одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 151, 171, 191, 146, 166 или 186.

Аминокислотные последовательности могут отличаться от последовательностей, представленных в любой из SEQ ID NO: 151, 171, 191, 146, 166 или 186, только консервативными аминокислотными заменами. Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых указанных выше последовательностей ID только одной, двумя или тремя аминокислотами.

В предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110, FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105, FR7 содержит аминокис-

кислотную последовательность SEQ ID NO: 125 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

В альтернативном варианте FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 могут иметь аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 89, 110, 130, 131, 84, 105 или 125.

Например, в этом аспекте изобретения FR1 и/или FR4 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 70-89; FR2 и/или FR5 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 91-110; FR3 и/или FR6 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 111-130, и FR4 и/или FR8 могут содержать любые аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 131-133.

В особенно предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 68.

В другом варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 68, или по меньшей мере на 80% идентична каркасным областям, пронумерованным по Kabat, где указанное бипаратопное нанотело может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит, в основном, последовательности CDR, которые представлены в SEQ ID NO: 68 и которые были модифицированы в каркасных областях так, чтобы они включали одну или несколько последовательность-оптимизирующих замен, предпочтительно одну или несколько замен, указанных в табл. 30 для нанотела 54B12 и в табл. 24 для нанотела 163E3. Нанотело 54B12 предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 219 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 219, а нанотело 163E3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 217. Так, например, каркасные области этих нанотел могут иметь последовательность каркасных областей FR1, FR2, FR3 или FR4, пронумерованных по Kabat и представленных в любой из SEQ ID NO: 213-219 в табл. 32. Предпочтительно такое бипаратопное нанотело с оптимизированной последовательностью может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

15) 54B12/97A9 (SEQ ID NO: 90 и 39).

Этот вариант осуществления изобретения относится к бипаратопному нанотелу, где указанное первое нанотело, определенное выше, включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 141, 161 и 181, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 141, 161 или 181, и где указанное второе нанотело включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 143, 163 и 183, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 143, 163 или 183.

Бипаратопное нанотело предпочтительно имеет структуру

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

где в указанном первом нанотеле CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181, и где в указанном втором нанотеле CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, или где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любой одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 141, 161, 181, 143, 163 или 183.

Аминокислотные последовательности могут отличаться от последовательностей, представленных в любой из SEQ ID NO: 141, 161, 181, 143, 163 или 183, только консервативными аминокислотными заменами. Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых указанных выше последовательностей ID только одной, двумя или тремя аминокислотами.

В предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID

NO: 110, FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122; и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

В альтернативном варианте FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 могут иметь аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 89, 110, 130, 131, 81, 102 или 122.

Например, в этом аспекте изобретения FR1 и/или FR4 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 70-89; FR2 и/или FR5 могут содержать любые аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 91-110; FR3 и/или FR6 могут содержать любые аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 111-130, и FR4 и/или FR8 могут содержать любые аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 131-133.

В особенно предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотные последовательности в SEQ ID NO: 90 и 39 или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 90 и 39.

В другом варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90 и 39, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 90 и 39, или по меньшей мере на 80% идентична каркасным областям, пронумерованным по Kabat, где указанное бипаратопное нанотело может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит, в основном, последовательности CDR, которые представлены в SEQ ID NO: 90 и 39, и которые были модифицированы в каркасных областях так, чтобы они включали одну или несколько последовательность-оптимизирующих замен, предпочтительно одну или несколько замен, указанных в табл. 30 для нанотела 54B12, и в табл. 22 для нанотела 97A9. Нанотело 54B12 предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90 и 39 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 90 и/или 39, а нанотело 97A9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 215. Так, например, каркасные области этих нанотел могут иметь последовательность каркасных областей FR1, FR2, FR3 или FR4, пронумерованных по Kabat и представленных в любой из SEQ ID NO: 213-219 в табл. 32. Предпочтительно такое бипаратопное нанотело с оптимизированной последовательностью может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

16) 97A9/127D1 (SEQ ID NO: 39 и 37).

Этот вариант осуществления изобретения относится к бипаратопному нанотелу, где указанное второе нанотело, определенное выше, включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 143, 163 и 183, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 143, 163 или 183, и где указанное первое нанотело включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 141, 161 и 181, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 141, 161 или 181.

Бипаратопное нанотело предпочтительно имеет структуру

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

где в указанном втором нанотеле CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, и где в указанном первом нанотеле, CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181, или где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любой одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 143, 163, 183, 141, 161 или 181.

Аминокислотные последовательности могут отличаться от последовательностей, представленных в любой из SEQ ID NO: 143, 163, 183, 141, 161 или 181, только консервативными аминокислотными заменами. Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых указанных выше последова-

тельностью ID только одной, двумя или тремя аминокислотами.

В предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122, FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133, FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120; и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

В альтернативном варианте, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 могут иметь аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 81, 102, 122, 133, 79, 100, 120 или 131.

Например, в этом аспекте изобретения FR1 и/или FR4 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 70-89, FR2 и/или FR5 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 91-110, FR3 и/или FR6 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 111-130, и FR4 и/или FR8 могут содержать любые аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 131-133.

В особенно предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 39 и 37 или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39 и/или 37.

В другом варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 39 и 37, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 39 и/или 37, или по меньшей мере на 80% идентична каркасным областям, пронумерованным по Kabat, где указанное бипаратопное нанотело может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит, в основном, последовательности CDR, которые представлены в SEQ ID NO: 39 и 37, и которые были модифицированы в каркасных областях так, чтобы они включали одну или несколько последовательность-оптимизирующих замен, предпочтительно одну или несколько замен, указанных в табл. 22 для нанотела 97A9 и в табл. 26 для нанотела 97A9. Нанотело 97A9 предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39 и 37 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39 и 37, а нанотело 127D1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 216. Так, например, каркасные области этих нанотел могут иметь последовательность каркасных областей FR1, FR2, FR3 или FR4, пронумерованных по Kabat и представленных в любой из SEQ ID NO: 213-219 в табл. 32. Предпочтительно такое бипаратопное нанотело с оптимизированной последовательностью может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

17) 163D2/2B2 (SEQ ID NO: 67).

Этот вариант осуществления изобретения относится к бипаратопному нанотелу, где указанное второе нанотело, определенное выше, включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 145, 165 и 185, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 145, 165 или 185, и где указанное первое нанотело включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 147, 167 и 187, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 147, 167 или 187.

Бипаратопное нанотело предпочтительно имеет структуру

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

где в указанном втором нанотеле, CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145; CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 185, и где в указанном первом нанотеле, CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 167, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 187, или где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любой одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 145, 165, 185, 147, 167 или 187.

Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых последовательностей из SEQ ID NO: 145, 165, 185, 147, 167 или 187 только консервативными аминокислотными заменами. Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых указанных выше последовательностей ID только одной, двумя или тремя аминокислотами.

В предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104, FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124, FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

В альтернативном варианте FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 могут иметь аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 83, 104, 124, 131, 85, 106 или 126.

Например, в этом аспекте изобретения FR1 и/или FR4 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 70-89; FR2 и/или FR5 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 91-110; FR3 и/или FR6 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 111-130, и FR4 и/или FR8 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 131-133.

В особенно предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 67.

В другом варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 67, или по меньшей мере на 80% идентична каркасным областям, пронумерованным по Kabat, где указанное бипаратопное нанотело может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит, в основном, последовательности CDR, которые представлены в SEQ ID NO: 67 и которые были модифицированы в каркасных областях так, чтобы они включали одну или несколько последовательность-оптимизирующих замен, предпочтительно одну или несколько замен, указанных в табл. 28 для нанотела 163D2 и в табл. 20 для нанотела 2B2. Нанотело 163D2 предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 218, а нанотело 2B2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213 или 214, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 213 или 214. Так, например, каркасные области этих нанотел могут иметь последовательность каркасных областей FR1, FR2, FR3 или FR4, пронумерованных по Kabat и представленных в любой из SEQ ID NO: 213-219 в табл. 32. Предпочтительно такое бипаратопное нанотело с оптимизированной последовательностью может ингибировать связывание GRO α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

18) 163E3/2B2 (SEQ ID NO: 66).

Этот вариант осуществления изобретения относится к бипаратопному нанотелу, где указанное второе нанотело, определенное выше, включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146, 166 и 186, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 146, 166 или 186, и где указанное первое нанотело включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 147, 167 и 187, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 147, 167 или 187.

Бипаратопное нанотело предпочтительно имеет структуру

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

где в указанном втором нанотеле, CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 166, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186 и где в указанном первом нанотеле CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147, CDR5 содержит аминокислотную последователь-

ность SEQ ID NO: 167, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 187, или где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны любой одной из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 146, 166, 186, 147, 167 или 187.

Аминокислотные последовательности могут отличаться от последовательностей, представленных в любой из SEQ ID NO: 146, 166, 186, 147, 167 или 187, только консервативными аминокислотными заменами. Аминокислотные последовательности могут отличаться от любых указанных выше последовательностей ID только одной, двумя или тремя аминокислотами.

В предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105, FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125, FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131, FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126; и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

В альтернативном варианте FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 могут иметь аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 84, 105, 125, 131, 85, 106 или 126.

Например, в этом аспекте изобретения FR1 и/или FR4 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 70-89; FR2 и/или FR5 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 91-110; FR3 и/или FR6 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 111-130, и FR4 и/или FR8 могут содержать аминокислотные последовательности, представленные в любой из SEQ ID NO: 131-133.

В особенно предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66.

В другом варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 66 или по меньшей мере на 80% идентична каркасным областям, пронумерованным по Kabat, где указанное бипаратопное нанотело может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления этого аспекта изобретения бипаратопное нанотело по изобретению содержит, в основном, последовательности CDR, которые представлены в SEQ ID NO: 66 и которые были модифицированы в каркасных областях так, чтобы они включали одну или несколько последовательность-оптимизирующих замен, предпочтительно одну или несколько замен, указанных в табл. 24 для нанотела 163E3 и в табл. 20 для нанотела 2B2. Нанотело 163E3 предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 217, а нанотело 2B2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213 или 214 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 213 или 214. Так, например, каркасные области этих нанотел могут иметь последовательность каркасных областей FR1, FR2, FR3 или FR4, пронумерованных по Kabat и представленных в любой из SEQ ID NO: 213-219 в табл. 32. Предпочтительно такое бипаратопное нанотело с оптимизированной последовательностью может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC₅₀ менее чем 20 нМ.

Как уже обсуждалось выше, если предпочтительные бипаратопные нанотела по изобретению, включая их конкретные варианты и модификации, обозначенные 163D2/127D1, 163E3/127D1, 163E3/54B12, 163D2/54B12, 2B2/163E3, 2B2/163D2, 97A9/2B2, 97A9/54B12, 127D1/163D2, 127D1/163E3, 127D1/97A9, 2B2/97A9, 54B12/163D2, 54B12/163E3, 54B12/97A9, 97A9/127D1, 163D2/2B2 или 163E3/2B2, имеют в своих каркасных областях по меньшей мере одну последовательность-оптимизирующую аминокислотную замену, то желательно, чтобы указанные каркасные области были, например, частично или полностью гуманизированными. Желательно, чтобы степень оптимизации последовательности позволяла получить бипаратопное нанотело, имеющее аминокислотную последовательность, которая была бы на 80-90% идентична, по меньшей мере, в каркасных областях последовательностям SEQ ID NO: 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47, 61, 53, 54, 46, 69, 68, 67 или 66.

Варианты осуществления настоящего изобретения также включают полипептиды, в которых пер-

ность SEQ ID NO: 171, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191, а полипептид, содержащийся в указанном первом иммуноглобулине, состоящем из одного вариабельного домена, содержит CDR4, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143; CDR5, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 235, и CDR6, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183. В других вариантах осуществления изобретения аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на 95% идентичны любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 151, 171, 191, 143, 235 или 183.

В другом варианте осуществления изобретения полипептид содержит аминокислотные последовательности, отличающиеся от последовательностей SEQ ID NO: 151, 171, 191, 143, 235 или 183 только консервативными аминокислотными заменами.

В другом варианте осуществления изобретения полипептид содержит первый антигенсвязывающий домен, выбранный из SEQ ID NO: 219 или полипептида, который по меньшей мере на 80%, а именно по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на 95% идентичен последовательности SEQ ID NO: 219, и второй антигенсвязывающий домен, выбранный из SEQ ID NO: 215 или полипептида, который по меньшей мере на 80%, а именно по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на 95% идентичен последовательности SEQ ID NO: 215, где указанные домены разделены линкером, имеющим SEQ ID NO: 220.

Что касается вышеприведенного обсуждения предпочтительных вариантов осуществления изобретения, то в этой связи следует отметить, что хотя это обсуждение конкретно относится к бипаратопным нанотелам, однако оно также относится и к бипаратопным полипептидам, которые направлены непосредственно против CXCR2 или связываются с CXCR2, где первый и второй связывающие домены содержатся в стандартных четырехцепочечных антителах, антителах с тяжелыми цепями, в одноцепочечных Fv, Fab или Fab₍₂₎, но обладают одним или несколькими функциональными или структурными признаками вышеуказанных предпочтительных вариантов.

Также кратко описаны варианты осуществления, в которых первый и второй антигенсвязывающие домены содержатся в иммуноглобулине, имеющем только вариабельные домены, такие как V_L-домены, V_H-домены, (dAb)- и V_{HH}-домены и их фрагменты, и которые обладают одним или несколькими функциональными или структурными признаками каждого из вышеупомянутых вариантов осуществления.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептидам, в частности к иммуноглобулину с отдельными вариабельными доменами, такими как V_{HH}-домен, или к нанотелам, которые являются одновалентными в отношении связывания с CXCR2 и которые представляют собой структурные блоки для бипаратопных полипептидов по изобретению и могут рассматриваться как промежуточные соединения в способе их получения.

Предпочтительными одновалентными иммуноглобулинами с отдельными вариабельными доменами являются полипептиды, имеющие последовательности SEQ ID NO: 25-43 и 90 в табл. 9, или полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 25-43 и 90.

Предпочтительным одновалентным полипептидом является полипептид, обозначенный 137B7 и содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36. В предпочтительном варианте осуществления изобретения каркасные области SEQ ID NO: 36 имеют одну или несколько последовательность-оптимизирующих аминокислотных замен.

Другими предпочтительными одновалентными полипептидами являются полипептиды, обозначенные 127D1, 2B2, 54B12, 97A9, 163D2 и 163E3, включая полипептиды, имеющие оптимизированную последовательность в каркасных областях.

Например, 127D1 может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, в которую были введены одна или несколько последовательность-оптимизирующих аминокислотных замен, представленных в табл. 26, предпочтительно полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216.

Полипептид 2B2 может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, в которую были введены одна или несколько последовательность-оптимизирующих замен, представленных в табл. 20, предпочтительно полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213 или 214.

Полипептид 54B12 может содержать последовательность SEQ ID NO: 90, в которую были введены одна или несколько последовательность-оптимизирующих замен, представленных в табл. 30, предпочтительно полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 219.

Полипептид 97A9 может содержать последовательность SEQ ID NO: 39, в которую были введены одна или несколько последовательность-оптимизирующих замен, представленных в табл. 22, предпочтительно полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215.

Полипептид 163D2 может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, в которую были введены одна или несколько последовательность-оптимизирующих замен, представленных в табл. 28, предпочтительно полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218.

Полипептид 163E3 может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, в которую были введены одна или несколько последовательность-оптимизирующих замен, представленных в табл. 24, предпочтительно полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217.

В этот аспект изобретения также входят одновалентные полипептиды, в частности иммуноглобулины с одними переменными доменами, такие как нанотела, обладающие способностью перекрестно блокировать связывание CXCR2 с полипептидом, имеющим любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47 или 61.

Любое из обсуждаемых выше предпочтительных одновалентных нанотел, в частности 137B7, может быть использовано в описанных в настоящем документе целях, например, для лечения ХОБЛ.

Бипаратопные полипептиды по изобретению, в частности, предпочтительные отдельные переменные домены бипаратопного иммуноглобулина, обсуждаемые выше, включая все их верблужьи и гуманизированные варианты, представляют собой модуляторы CXCR2, которые, в частности, ингибируют передачу CXCR2-сигнала.

Предпочтительно CDR-последовательности и FR-последовательности в бипаратопных полипептидах, в частности в отдельных переменных доменах бипаратопного иммуноглобулина по изобретению, отличаются тем, что они

связываются с CXCR2 с константой диссоциации (K_D), составляющей 10^{-5} - 10^{-12} моль/л или менее, предпочтительно 10^{-7} - 10^{-2} моль/л или менее, а более предпочтительно 10^{-8} - 10^{-12} моль/л (т.е. с константой ассоциации (K_A) 10^5 - 10^{12} л/моль или более, предпочтительно 10^7 - 10^{12} л/моль или более, а более предпочтительно 10^8 - 10^{12} л/моль);

и/или тем, что они

связываются с CXCR2 с константой скорости ассоциации k_{on} , составляющей от 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ и приблизительно до 10^7 $M^{-1}s^{-1}$; предпочтительно от 10^3 до 10^7 $M^{-1}s^{-1}$; более предпочтительно от 10^4 до 10^7 $M^{-1}s^{-1}$; а именно от 10^5 до 10^7 $M^{-1}s^{-1}$;

и/или тем, что они

связываются с CXCR2 с константой скорости диссоциации k_{off} , составляющей от 1 s^{-1} ($t_{1/2} = 0,69$ с) до 10^{-6} s^{-1} (с образованием почти необратимого комплекса с $t_{1/2}$, составляющим несколько дней), предпочтительно от 10^{-2} до 10^{-6} s^{-1} , более предпочтительно от 10^{-3} до 10^{-6} s^{-1} , а именно 10^{-4} до 10^{-6} s^{-1} .

Предпочтительно, чтобы CDR-последовательности и FR-последовательности, присутствующие в полипептидах и в отдельных переменных доменах бипаратопного иммуноглобулина по изобретению, связывались с CXCR2 с аффинностью менее чем 500 нМ, предпочтительно менее чем 200 нМ, более предпочтительно менее чем 10 нМ, например менее чем 500 пМ.

В частности, как описано в примерах, предпочтительные бипаратопные нанотела по изобретению способны ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC_{50} менее чем 20 нМ. Предпочтительные бипаратопные нанотела по изобретению могут также ингибировать индуцированное агонистом (GRO- α) высвобождение Ca из CXCR2-несущих эритроцитов (RBL) с IC_{50} менее чем 100 нМ. Предпочтительные бипаратопные нанотела по изобретению могут также ингибировать индуцированную агонистом (GRO- α) аккумуляцию [^{35}S]GTP γ S в CXCR2-СНО-мембранах с IC_{50} менее чем 50 нМ. Предпочтительные бипаратопные нанотела по изобретению могут также ингибировать изменение формы лейкоцитов человека после GRO- α -обработки с IC_{50} менее чем <1 нМ, или изменение формы лейкоцитов собакоподобных обезьян с IC_{50} менее чем <2 нМ.

В соответствии с наиболее предпочтительным аспектом изобретения бипаратопный полипептид по изобретению, такой как один переменный домен бипаратопного иммуноглобулина, например, описанное в настоящем документе нанотело, перекрестно блокирует связывание с CXCR2-полипептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и с любым или со всеми полипептидами из SEQ ID NO: 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47 или 61. Перекрестное блокирование может быть измерено любыми способами, хорошо известными специалистам.

Полипептиды по изобретению, подходящие для использования в фармацевтике, например полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; предпочтительно должен быть направлен непосредственно против CXCR2 человека, а полипептиды по изобретению, подходящие для их использования в ветеринарии, предпочтительно должны быть направлены против CXCR2, происходящего от вида животного, подвергающегося лечению, либо они должны быть способны перекрестно реагировать с CXCR2, происходящего от вида животного, подвергающегося лечению.

Кроме того, бипаратопный полипептид по изобретению может помимо по меньшей мере двух антигенсвязывающих доменов, связывающихся с CXCR2, содержать, но необязательно, один или несколько дополнительных сайтов связывания или доменов, связывающихся с другими эпитопами, антигенами, белками или мишенями.

Эффективность полипептидов по изобретению и композиций, содержащих указанные полипепти-

ды, может быть протестирована с помощью любого подходящего анализа *in vitro*, клеточного анализа, анализа *in vivo* и/или с помощью анализа на животном-модели, известного *per se*, или с помощью любых комбинаций этих анализов, где указанные анализы позволяют определить, что такой полипептид может быть использован для лечения ХОБЛ или любого другого заболевания, связанного с нарушением передачи CXCR2-сигнала. Подходящие анализы и животные-модели известны специалистам.

Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением полипептиды, направленные против CXCR2 человека, могут перекрестно реагировать, а могут и не реагировать с CXCR2, происходящим от теплокровных животных одного или нескольких других видов. Однако полипептиды по изобретению, направленные против CXCR2 человека и используемые в тестах на токсичность, предпочтительно должны перекрестно реагировать с CXCR2, происходящим от приматов одного или нескольких других видов (таких как, но не ограничивающихся ими, обезьяны, принадлежащие к роду *Macaca* (такие как, в частности, собакоподобные обезьяны (*Macaca fascicularis*) и/или макак-резус (*Macaca mulatta*)) и павианов (*Papio ursinus*)). Предпочтительной перекрестной реактивностью является реактивность с CXCR2 собакоподобных обезьян. При этом может оказаться желательной перекрестная реактивность с CXCR2, происходящим от животных одного или нескольких видов, которые часто используются в качестве модели заболевания (например, мыши, крысы, кролики, свиньи или собаки), в частности животные с моделью заболеваний и расстройств, связанных с CXCR2. В соответствии с этим, для специалиста в данной области очевидно, что такая перекрестная реактивность, если она существует, может иметь преимущество с точки зрения разработки лекарственных средств, поскольку это позволяет протестировать аминокислотные последовательности и полипептиды, направленные против CXCR2 человека, на указанных животных с моделью заболевания.

Более конкретно, полипептиды по изобретению, которые перекрестно реагируют с CXCR2 от млекопитающих многих видов, обычно имеют преимущества при их применении в ветеринарии, поскольку в данном случае, один и тот же полипептид может реагировать с CXCR2 многих видов.

Предпочтительно, чтобы бипаратопные полипептиды по изобретению были неспособны перекрестно реагировать с CXCR1 или CXCR4.

В бипаратопных полипептидах по изобретению по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт может быть направлен непосредственно против сайта взаимодействия, т.е. сайта, в котором CXCR2 взаимодействует с другой молекулой, например с его природным лигандом или лигандами.

Бипаратопный полипептид, например один переменный домен иммуноглобулина по изобретению, может представлять собой полипептид, в котором второй антигенсвязывающий домен, не связывающийся с линейным пептидом SEQ ID NO: 7, распознает эпитоп, содержащий пептиды, представленные в SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 или 12, или находящийся в этих пептидах. Кроме того, первый антигенсвязывающий домен может распознавать эпитоп, содержащий пептид SEQ ID NO: 7 или находящийся в этом пептиде.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, относящихся к перекрестной реакции с CXCR2 собакоподобных обезьян, первый антигенсвязывающий домен также распознает эпитоп, содержащий пептид SEQ ID NO: 4 или находящийся в этом пептиде. В таком варианте осуществления изобретения второй антигенсвязывающий домен может распознавать эпитоп, содержащий пептиды SEQ ID NO: 5 или 6 или находящийся в этих пептидах.

В объем настоящего изобретения также входят бипаратопные полипептиды других типов, в частности бипаратопные нуклеотиды, которые, в основном, связываются со всеми природными или синтетическими аналогами, вариантами, мутантами, аллелями, частями и фрагментами CXCR2; или по меньшей мере с аналогами, вариантами, мутантами, аллелями, частями и фрагментами CXCR2, содержащими одну или несколько антигенных детерминант, или один или несколько эпитопов, которые, по существу, аналогичны антигенной(ым) детерминанте(ам) или эпитопу(ам), с которыми связываются полипептиды по изобретению в CXCR2 (например, в CXCR2 дикого типа SEQ ID NO: 1). В этом случае полипептиды по изобретению могут связываться с указанными аналогами, вариантами, мутантами, аллелями, частями и фрагментами с аффинностью и/или специфичностью, аналогичными аффинности и/или специфичности связывания полипептидов по изобретению с CXCR2 (дикого типа), как обсуждается выше, или отличающимися от них (т.е. с более высокой или более низкой аффинностью или специфичностью).

Кроме того, как известно специалистам в данной области, бипаратопные полипептиды связываются с CXCR2 с большей avidностью, чем соответствующий полипептид с одним антигенсвязывающим доменом.

Кроме того, в объем настоящего изобретения также входят части, фрагменты, аналоги, мутанты, варианты, аллели и/или производные бипаратопных полипептидов, в частности отдельных переменных доменов бипаратопного иммуноглобулина по изобретению, используемых в различных обсуждаемых в настоящем документе терапевтических целях, при условии, что они включают релевантные функциональные домены, эквивалентные доменами полноразмерного полипептида. Такие части, фрагменты, аналоги, мутанты, варианты, аллели или производные могут иметь все функциональные свойства, обсуждаемые выше для бипаратопных полипептидов по изобретению.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к бипаратопному полипептиду, необязательно, к отдельным переменным доменам бипаратопного иммуноглобулина, который также, но

необязательно, содержит одну или несколько других групп, остатков, молекул, или связывающих единиц. Такие дополнительные группы, остатки, молекулы или аминокислотные последовательности могут сообщать, а могут и не сообщать, дополнительные функции полипептиду по изобретению и могут модифицировать, а могут и не модифицировать его свойства.

Например, такими дополнительными группами, остатками, молекулами или связывающими единицами могут быть одна или несколько дополнительных аминокислотных последовательностей, таких как (слитый) белок или (слитый) полипептид. В предпочтительном, но не ограничивающем аспекте изобретения, указанные одна или несколько других групп, остатков, молекул или связывающих единиц представляют собой последовательности иммуноглобулина. Еще более предпочтительно указанные одна или несколько других групп, остатков, молекул или связывающих единиц выбраны из группы, состоящей из доменных антител, аминокислотных последовательностей, которые могут быть использованы в качестве доменного антитела; однодоменных антител, аминокислотных последовательностей, которые могут быть использованы в качестве однодоменного антитела; "dAb"; аминокислотных последовательностей, которые могут быть использованы в качестве dAb, или нанотел.

Альтернативно, такими группами, остатками, молекулами или связывающими единицами могут быть, например, химические группы, остатки, молекулы, которые сами по себе могут обладать, а могут и не обладать биологической и/или фармакологической активностью. Например, такие группы могут быть связаны с одним или несколькими полипептидами по изобретению с образованием "производного" полипептида по изобретению, также описанного в настоящей заявке.

В таких конструкциях один или несколько полипептидов по изобретению и одна или несколько групп, остатков, молекул или связывающих единиц могут быть связаны друг с другом непосредственно и/или посредством одного или нескольких подходящих линкеров или спейсеров. Так, например, если одна или несколько групп, остатков, молекул или связывающих единиц представляют собой аминокислотные последовательности, то линкерами могут быть также аминокислотные последовательности, образующие конструкции, такие как слитый белок или слитый полипептид.

Как очевидно из вышеприведенного и нижеприведенного описания, это означает, что бипаратопные полипептиды по изобретению могут быть использованы в качестве "структурного блока", образующего другие полипептиды по изобретению, т.е. посредством их комбинирования с другими группами, остатками, молекулами или связывающими единицами с получением описанных в настоящем документе конструкций, которые являются мультипаратопными и, необязательно, поливалентными или мультиспецифическими, би/поливалентными и би/мультиспецифическими.

Полипептиды этого аспекта изобретения могут быть получены, в основном, методом, который включает по меньшей мере одну стадию соответствующего связывания одного или нескольких полипептидов по изобретению с одной или несколькими другими группами, остатками, молекулами или связывающими единицами посредством, но необязательно, одного или нескольких подходящих линкеров.

В одном конкретном аспекте изобретения бипаратопный полипептид по изобретению модифицирован так, чтобы он способствовал увеличению времени полужизни по сравнению с соответствующим немодифицированным полипептидом по изобретению. Исходя из приведенного в настоящем документе описания, для специалиста очевидно, что некоторыми предпочтительными полипептидами являются такие полипептиды, которые, например, содержат аминокислотные последовательности, или полипептиды по изобретению, которые были химически модифицированы в целях увеличения времени полужизни (например, посредством ПЭГилирования, ПАСилирования или ГЭЖилирования); причем полипептиды по изобретению могут содержать по меньшей мере один дополнительный сайт связывания с сывороточным белком (таким как сывороточный альбумин); либо полипептиды по изобретению могут содержать по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, связанную по меньшей мере с одной молекулой (в частности, по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью), которая способствует увеличению времени полужизни полипептида по изобретению. Примерами полипептидов по изобретению, содержащих такие молекулы или аминокислотные последовательности, способствующие увеличению времени полужизни, являются полипептиды, которые соответствующим образом связаны с одним или несколькими сывороточными белками, или их фрагментами (такими как сывороточный альбумин (человека) или его подходящие фрагменты) или с одной или несколькими связывающими единицами, которые могут связываться с сывороточными белками, такими как, например, доменные антитела, аминокислотные последовательности, которые могут быть использованы в качестве доменного антитела; однодоменные антитела, аминокислотные последовательности, которые могут быть использованы в качестве однодоменного антитела; "dAb", аминокислотные последовательности, которые могут быть использованы в качестве dAb, или нанотела, которые могут связываться с сывороточными белками, такими как сывороточный альбумин (такой как альбумин сыворотки человека), сывороточные иммуноглобулины, такие как IgG, или трансферрин; полипептиды, которые связаны с Fc-частью (такой как Fc человека) или их подходящие части, или фрагменты. В настоящее изобретение также входят полипептиды по изобретению, которые связаны с одним или несколькими небольшими белками или пептидами, которые могут связываться с сывороточными белками (такими как, но не ограничивающимися ими, белки и пептиды, описанные в WO 91/01743, WO 01/45746, WO 02/076489 и в предварительной заявке США Ablynx

N.V., озаглавленной "Peptides capable of binding to serum proteins" of Ablynx N.V. и поданной 5 декабря, 2006 (см. также РСТ/ЕР 2007/063348)).

Один из наиболее широко используемых методов увеличения времени полужизни и/или снижения иммуногенности фармацевтических белков включает присоединение подходящего фармакологически приемлемого полимера, такого как полиэтиленгликоль (ПЭГ) или его производные (такие как метокси-полиэтиленгликоль) или мПЭГ). Как правило, может быть использована любая форма ПЭГилирования, такая как ПЭГилирование, используемое для антител и фрагментов антител (включая, но не ограничиваясь ими, (одно)доменные антитела и scFv), и описание такого ПЭГилирования можно найти, например, в публикациях Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); by Veronese and Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003), by Harris and Chess, Nat. Rev. Drug. Discov., 2, (2003) и в WO 04/060965. Различные реагенты для ПЭГилирования белков также являются коммерчески доступными, например, они поставляются от Nektar Therapeutics, USA.

При этом предпочтительно использовать сайт-направленное ПЭГилирование, в частности ПЭГилирование с использованием цистеинового остатка (см., например, Yang et al., Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003)). Например, для этих целей, ПЭГ может быть присоединен к цистеиновому остатку, который обычно присутствует в бипаратопном нанотеле по изобретению. Бипаратопный полипептид по изобретению может быть модифицирован в целях соответствующего введения одного или нескольких цистеиновых остатков для присоединения ПЭГ, либо аминокислотная последовательность, содержащая один или нескольких цистеиновых остатков для присоединения ПЭГ, может быть связана с N- и/или C-концом бипаратопного полипептида, где все эти методы конструирования белков известны специалистам *per se*.

Для отдельных вариабельных доменов бипаратопного иммуноглобулина и полипептидов по изобретению предпочтительно использовать ПЭГ с молекулярной массой более чем 5000, а именно более чем 10000 и менее чем 200000, в частности менее чем 100000, например в интервале 20000-80000.

ПЭГилированию могут быть подвергнуты один или оба вариабельных домена иммуноглобулина и/или любая линкерная область пептида. Подходящие методы ПЭГилирования описаны в EP 1639011.

В качестве альтернативы ПЭГ время полужизни может быть увеличено методом, известным как ГЭКилирование, которое включает присоединение производных гидроксипропилированного крахмала (ГЭК) к полипептидам по изобретению. Используемым гидроксипропилированным крахмалом является амилопектин, происходящий от крахмала восковидной кукурузы, который был модифицирован посредством кислотного гидролиза для коррекции молекулярной массы, и в котором остатки глюкозы были гидроксипропилированы. Более подробное описание можно найти в публикации Pavisic R., et al., Int. J. Pharm (2010) March 15, 387 (1-2):110-9.

В общих чертах, предпочтительные полипептиды по изобретению с увеличенным временем полужизни имеют время полужизни, которое по меньшей мере в 1,5 раз, предпочтительно по меньшей мере в 2 раза, а именно по меньшей мере в 5 раз, например, по меньшей мере в 10 раз или более чем в 20 раз превышает время полужизни соответствующего полипептида по изобретению *per se*. Например, полипептиды по изобретению с увеличенным временем полужизни имеют время полужизни, которое по меньшей мере на 1 ч, предпочтительно более чем на 2 ч, более предпочтительно более чем на 6 ч, а именно более чем на 12 ч или даже более чем на 24, 48 или 72 ч превышает время полужизни соответствующего полипептида по изобретению *per se*.

В предпочтительном аспекте изобретения такие полипептиды по изобретению имеют время полужизни в сыворотке, которое по меньшей мере на 1 ч, предпочтительно более чем на 2 ч, более предпочтительно более чем на 6 ч, а именно более чем на 12 ч или даже более чем на 24, 48 или 72 ч превышает время полужизни соответствующих полипептидов по изобретению *per se*.

В другом предпочтительном аспекте изобретения полипептиды по изобретению имеют время полужизни в сыворотке человека, составляющее по меньшей мере приблизительно 12 ч, предпочтительно по меньшей мере 24 ч, более предпочтительно по меньшей мере 48 ч, а еще более предпочтительно по меньшей мере 72 ч или более. Например, полипептиды по изобретению могут иметь время полужизни, составляющее по меньшей мере 5 дней (а именно, приблизительно 5-10 дней), предпочтительно по меньшей мере 9 дней (а именно, приблизительно 9-14 дней), более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 10 дней (а именно, приблизительно 10-15 дней) или по меньшей мере приблизительно 11 дней (а именно, приблизительно 11-16 дней), более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 12 дней (а именно, приблизительно 12-18 дней или более), или более чем 14 дней (а именно, приблизительно 14-19 дней).

Настоящее изобретение также относится к способам получения или продуцирования описанных в настоящем документе полипептидов, нуклеиновых кислот, клеток-хозяев и композиций по изобретению.

В общих чертах, такие способы могут включать стадии:

- a) получение серии, набора или библиотеки полипептидов; и
- b) скрининг указанных серий, наборов или библиотек полипептидов на аминокислотные последовательности, которые могут связываться с CXCR2 и/или обладают аффинностью к CXCR2; и
- c) выделение аминокислотной(ых) последовательности(ей), которая(ые) может(могут) связываться

с CXCR2 и/или обладает(ют) аффинностью к CXCR2.

Серия, набор или библиотека полипептидов могут представлять собой серию, набор или библиотеку последовательностей иммуноглобулина (описанных в настоящей заявке), такие как наивная серия, набор или библиотека последовательностей иммуноглобулина; синтетические или полусинтетические серии, набор или библиотека последовательностей иммуноглобулина; и/или серия, набор или библиотека последовательностей иммуноглобулина, которые были подвергнуты созреванию аффинности.

Кроме того, в этом способе серией, набором или библиотекой полипептидов могут быть серия, набор или библиотека переменных доменов тяжелой цепи (таких как V_H-домены или V_{HH}-домены) или переменных доменов легкой цепи. Например, серией, набором или библиотекой полипептидов могут быть серия, набор или библиотека доменных антител или однодоменных антител, либо ими могут быть серия, набор или библиотека аминокислотных последовательностей, которые способны функционировать как доменное антитело или однодоменное антитело.

В предпочтительном аспекте этого способа серией, набором или библиотекой полипептидов могут быть иммунная серия, набор или библиотека последовательностей иммуноглобулина, происходящих, например, от млекопитающего, например от ламы, которая была соответствующим образом иммунизирована рецептором CXCR2 или соответствующей антигенной детерминантой, полученной на его основе или происходящей от него, такой как антигенный участок, антигенный фрагмент, антигенная область, антигенный домен, антигенная петля или другие их эпитопы.

В вышеописанных способах для облегчения скрининга серия, набор или библиотека пептидов или полипептидов могут быть представлены на фаге, фагмиде, рибосоме или на подходящем микроорганизме (таком как дрожжи). Подходящие способы, технологии и организмы-хозяева, используемые для представления и скрининга (серии, набора или библиотеки) аминокислотных последовательностей, могут быть выбраны специалистом, например, исходя из настоящего описания. Специалист может также обратиться к публикации Hoogenboom in *Nature Biotechnology*, 23, 9, 1105-1116 (2005).

В другом аспекте изобретения способ получения полипептидов для их использования в целях конструирования бипаратопного полипептида по изобретению включает по меньшей мере одну из следующих стадий:

- a) получение набора или образца клеток, экспрессирующих полипептиды;
- b) скрининг указанного набора или образца клеток в целях выявления клеток, экспрессирующих полипептид, который способен связываться с CXCR2 и/или обладает аффинностью к CXCR2; и
- c) либо (i) выделение указанного полипептида; либо (ii) выделение из указанной клетки последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный полипептид, и осуществление последующей экспрессии указанного полипептида.

Например, если предпочтительным полипептидом является последовательность иммуноглобулина, то таким набором или образцом клеток могут быть, например, набор или образец В-клеток. Кроме того, в этом способе образцы клеток могут быть получены от млекопитающего, например, от ламы, которая была соответствующим образом иммунизирована рецептором CXCR2 или соответствующей антигенной детерминантой, полученной на его основе или происходящей от него, такой как антигенный участок, антигенный фрагмент, антигенная область, антигенный домен, антигенная петля или другие их эпитопы. В одном конкретном аспекте изобретения указанной антигенной детерминантой могут быть внеклеточные участки, области, домены, петли или другие внеклеточные эпитопы.

Для получения предпочтительных бипаратопных нанотел по изобретению, описанных в настоящей заявке, ламу иммунизируют клетками млекопитающего, экспрессирующими CXCR2 человека; клетками млекопитающего, экспрессирующими CXCR2 собакоподобных обезьян; ДНК, кодирующей полноразмерный CXCR2 человека; ДНК, кодирующей D1-17 CXCR2 человека; ДНК, кодирующей CXCR2 собакоподобных обезьян, и пептидами, представленными в табл. 5.

Описанный выше скрининг может быть осуществлен любым подходящим способом, известным специалисту. Описание таких способов можно найти, например, в EP 0542810, WO 05/19824, WO 04/051268 и WO 04/106377. Стадию скрининга (b), предпочтительно, осуществляют способом проточной цитометрии, такой как FACS. Описание этого способа можно найти, например, в публикации Lieby et al., *Blood*, Vol. 97, No. 12, 3820 (2001).

В другом аспекте изобретения способ получения полипептида, направленного против CXCR2, в целях его использования для конструирования полипептида по изобретению, может содержать по меньшей мере одну из нижеследующих стадий:

- a) получение серии, набора или библиотеки последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид;
- b) скрининг указанных серии, набора или библиотеки последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, которая может связываться с CXCR2 и/или обладает аффинностью к CXCR2; и
- c) выделение указанной последовательности нуклеиновой кислоты и осуществление последующей экспрессии указанного полипептида.

В таком способе серией, набором или библиотекой последовательностей нуклеиновой кислоты, ко-

дирующей полипептид, могут быть, например, серия, набор или библиотека последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующей природную серию, набор или библиотеку последовательностей иммуноглобулина; серия, набор или библиотека последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих синтетическую или полусинтетическую серию, набор или библиотеку последовательностей иммуноглобулина; и/или серия, набор или библиотека последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих серию, набор или библиотеку последовательностей иммуноглобулина, которые были подвергнуты созреванию аффинности.

Кроме того, в этом способе серия, набор или библиотека последовательностей нуклеиновой кислоты могут кодировать серию, набор или библиотеку переменных доменов тяжелой цепи (таких как V_H -домены или V_{HH} -домены) или переменных доменов легкой цепи. Например, серия, набор или библиотека последовательностей нуклеиновой кислоты могут кодировать серию, набор или библиотеку доменных антител или однодоменных антител, либо серию, набор или библиотеку аминокислотных последовательностей, которые способны функционировать как доменное антитело или однодоменное антитело.

В предпочтительном аспекте этого способа серия, набором или библиотекой последовательностей нуклеиновой кислоты могут быть иммунная серия, иммунный набор или иммунная библиотека последовательностей нуклеиновой кислоты, происходящих, например, от млекопитающих, которые были соответствующим образом иммунизированы рецептором CXCR2 или соответствующей антигенной детерминантой, полученной на его основе или происходящей от него, такой как антигенный участок, антигенный фрагмент, антигенная область, антигенный домен, антигенная петля или другие их эпитопы. В одном конкретном аспекте изобретения указанной антигенной детерминантой могут быть внеклеточные участки, области, домены, петли или другие внеклеточные эпитопы.

При получении полипептидов по изобретению лам иммунизируют антигенами, как описано выше.

В вышеописанных способах для облегчения скрининга серия, набор или библиотека последовательностей нуклеиновой кислоты могут быть представлены на фаге, фагмиде, рибосоме или на подходящем микроорганизме (таком как дрожжи). Подходящие способы, технологии и организмы-хозяева, используемые для представления и скрининга (серии, набора или библиотеки) нуклеотидных последовательностей, кодирующих аминокислотные последовательности, могут быть выбраны специалистом, например, исходя из настоящего описания. Специалист может также обратиться к публикации Hoogenboom in Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005).

В другом аспекте изобретения способ получения полипептида, который направлен против CXCR2 и который может быть использован в бипаратопных полипептидах по изобретению, может включать по меньшей мере одну из следующих стадий:

- a) получение серии, набора или библиотеки последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептиды;
- b) скрининг указанных серии, набора или библиотеки последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих аминокислотную последовательность, которая может связываться с CXCR2 и/или обладает аффинностью к CXCR2, и которая перекрестно блокируется бипаратопным нанотелом по изобретению или перекрестно блокирует бипаратопное нанотело по изобретению, например, кодируемое последовательностями SEQ ID NO: 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47 или 61; и
- c) выделение указанной последовательности нуклеиновой кислоты и последующее осуществление экспрессии указанного полипептида.

Настоящее изобретение также относится к бипаратопным полипептидам, которые могут быть получены вышеописанными способами, или альтернативно, способом, который включает проведение одной из вышеописанных стадий, и кроме того, по меньшей мере, стадий определения нуклеотидной последовательности или аминокислотной последовательности указанной последовательности иммуноглобулина и экспрессии или синтеза указанной аминокислотной последовательности способом, известным *per se*, например экспрессии в подходящей клетке-хозяине или в организме-хозяине, или стадий химического синтеза и конструирования бипаратопного полипептида на основе продуктов этого синтеза.

Вышеуказанный способ может быть осуществлен с применением любой подходящей технологии, известной специалистам и более подробно обсуждаемой ниже. Описание таких способов можно найти, например, в EP 0542810, WO 05/19824, WO 04/051268 и WO 04/106377. Например, стадию скрининга (b) предпочтительно осуществляют способом проточной цитометрии, такой как FACS. Описание этого способа можно найти, например, в публикации Lieby et al., Blood, Vol. 97, No. 12, 3820. Конкретное описание так называемого способа "Nanoclone™" можно найти в международной заявке WO 06/079372, Ablynx N.V.

Другой способ получения последовательностей V_{HH} или последовательностей нанотел, направленных против CXCR2, включает соответствующую иммунизацию трансгенного млекопитающего, способного экспрессировать антитела с тяжелой цепью (т.е. иммунизацию, проводимую в целях повышения иммунного ответа) и/или антитела с тяжелой цепью, направленные непосредственно против CXCR2, получение подходящего биологического образца от указанного трансгенного млекопитающего, который содержит (кодирующие последовательности нуклеиновой кислоты) указанные последовательности V_{HH} или последовательности нанотела (где указанным образцом являются пробы крови, пробы сыворотки

или образец В-клеток), а затем получение последовательностей V_{HH} , направленных против CXCR2, из указанного образца с использованием любого подходящего способа, известного *per se* (такого как любой из описанных в настоящем документе методов или гибридомный метод). Например, для этих целей могут быть использованы мыши, экспрессирующие антитело с тяжелой цепью, и могут быть использованы другие способы и технологии, описанные в WO 02/085945, WO 04/049794 и WO 06/008548 и в публикации Janssens et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006 Oct 10; 103(41):15130-5. Например, у такой мыши, экспрессирующей антитело с тяжелой цепью, могут экспрессироваться антитела с тяжелой цепью, содержащие любой подходящий (один) переменный домен, например, (отдельные) переменные домены, происходящие от природных источников (например, (отдельные) переменные домены человека, верблюжьих (отдельные) переменные домены или (отдельные) переменные домены акулы), а также, например, синтетические или полусинтетические (отдельные) переменные домены.

Специалистам известны и другие подходящие способы и технологии получения нанотел, используемых в настоящем изобретении, и/или нуклеиновых кислот, кодирующих указанные нанотела, происходящие от природных последовательностей V_H или предпочтительно последовательностей V_{HH} , и, например, описание таких методов можно найти на стр. 64 упомянутой в настоящем документе заявки WO 08/00279 A.

Домены V_{HH} или нанотела могут быть охарактеризованы по одному или нескольким "ключевым остаткам", присутствующим в их FR. Ключевыми остатками являются остатки, которые позволяют идентифицировать FR как FR, происходящую от животных семейства верблюжьих, например от ламы. В соответствии с этим ключевыми остатками являются желаемая мишень для замены, а предпочтительно замены человеческими остатками.

В соответствии с нумерацией Kabat ключевые остатки могут присутствовать в положениях 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 или 108 в нанотеле. Неограничивающие примеры (их подходящие комбинации) таких каркасных последовательностей и альтернативных ключевых остатков приводятся на стр. 65-98 заявки WO 2008/020079, которые во всей своей полноте вводятся в настоящее описание в качестве ссылки. В настоящем изобретении также рассматриваются и другие известные специалистам гуманизированные или частично гуманизированные последовательности, которые входят в объем настоящего изобретения.

Как уже обсуждалось выше, нанотело, используемое в настоящем изобретении, может иметь, по меньшей мере, "отличие в одной аминокислоте" (как определено в настоящей заявке) по меньшей мере в одной из каркасных областей по сравнению с соответствующей каркасной областью природного V_H -домена человека, в частности по сравнению с соответствующей каркасной областью DP-47. Более конкретно, в соответствии с одним из неограничивающих аспектов изобретения нанотело может иметь, по меньшей мере, "отличие в одной аминокислоте" (как определено в настоящей заявке) по меньшей мере в одном из ключевых остатков (включая остатки в положениях 108, 103 и/или 45) по сравнению с соответствующей каркасной областью природного человеческого V_H -домена, в частности по сравнению с соответствующей каркасной областью DP-47. Обычно нанотело имеет, по меньшей мере, отличие в одной такой аминокислоте в природном V_H -доме по меньшей мере в одной из FR2 и/или FR4, в частности по меньшей мере в одном из ключевых остатков в FR2 и/или FR4 (также включая остатки в положениях 108, 103 и/или 45).

Кроме того, гуманизированное нанотело по изобретению может быть таким, как оно определено в настоящем описании, при условии, что оно имеет, по меньшей мере, "отличие в одной аминокислоте" (как определено в настоящей заявке) по меньшей мере в одной из каркасных областей по сравнению с соответствующей каркасной областью природного V_{HH} -домена. Более конкретно, в соответствии с одним из неограничивающих аспектов изобретения нанотело с гуманизированной или какой-либо иначе оптимизированной последовательностью может быть таким, как оно определено в описании настоящей заявки, при условии, что оно будет иметь, по меньшей мере, "отличие в одной аминокислоте" (как определено в настоящей заявке) по меньшей мере в одном из ключевых остатков (включая остатки в положениях 108, 103 и/или 45) по сравнению с соответствующей каркасной областью природного V_{HH} -домена. Обычно нанотело с гуманизированной или как-либо иначе оптимизированной последовательностью имеет, по меньшей мере, отличие в одной такой аминокислоте в природном V_{HH} -доме по меньшей мере в одной из FR2 и/или FR4, в частности по меньшей мере в одном из ключевых остатков в FR2 и/или FR4 (также включая остатки в положениях 108, 103 и/или 45).

Как будет очевидно из настоящего описания, объем настоящего изобретения охватывает применение природных или синтетических аналогов, мутантов, вариантов, аллелей, гомологов и ортологов (называемых в настоящем документе общим термином "аналоги") одного переменного домена иммуноглобулина по изобретению, определенного в настоящей заявке, в частности аналогов бипаратопных нанотел SEQ ID NO: 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47, 61, 53, 54, 46, 69, 68, 67 или 66.

Как правило, в таких аналогах один или несколько аминокислотных остатков могут быть заменены, делетированы и/или добавлены по сравнению с отдельными переменными доменами иммуноглобулина по изобретению, определенными в настоящей заявке. Такие замены, инсерции или делеции могут быть введены в одну или несколько каркасных областей и/или в одну или несколько CDR. Если такие замены,

инсерции или делеции были сделаны в одной или нескольких каркасных областях, то они могут быть введены в положения одного или нескольких ключевых остатков и/или в одно или несколько других положений каркасных остатков, хотя, по существу, замены, инсерции или делеции в ключевых остатках являются менее предпочтительными (если только они не являются подходящими гуманизирующими заменами, описанными в настоящей заявке).

В одном из неограничивающих примеров заменой может быть, например, консервативная замена (описанная в настоящей заявке), и/или аминокислотный остаток может быть заменен другим аминокислотным остатком, который обычно присутствует в том же самом положении в другом V_{HH} -домене (некоторые неограничивающие примеры таких замен можно найти в WO 2008/020079), хотя настоящее изобретение не ограничивается такой заменой. Таким образом, в объем настоящего изобретения входят любые одна или несколько замен, делеций или инсерций или любые их комбинации, которые либо способствуют улучшению свойств, например, нанотела, используемого для получения бипаратопного нанотела по изобретению, либо, по меньшей мере, существенно не ухудшают нужные свойства или баланс или комбинацию нужных свойств по изобретению (т.е. не ухудшают до той степени, когда нанотело или бипаратопное нанотело будет уже непригодным для его использования в нужных целях). Специалист в данной области, по существу, может самостоятельно определить и выбрать подходящие замены, делеции или инсерции или подходящие их комбинации исходя из приведенного в настоящем документе описания и, необязательно, после нетрудоемкого рутинного экспериментирования, которое может, например, включать введение ограниченного числа возможных замен и определение их влияния на свойства полученных таким образом нанотел.

Например, в зависимости от организма-хозяина, используемого для экспрессии бипаратопного нанотела или полипептида по изобретению, такие делеции и/или замены могут быть внесены так, чтобы были удалены один или несколько сайтов посттрансляционной модификации (такие как один или несколько сайтов гликозилирования), и такие делеции и/или замены могут быть легко осуществлены специалистом в данной области. Альтернативно, замены или инсерции могут быть сделаны для введения одного или нескольких сайтов присоединения функциональных групп (как описано в настоящей заявке), например, для сайт-специфического ПЭГилирования (как описано в настоящей заявке).

Как описано в общих чертах в настоящей заявке, подбор наиболее благоприятных замен, инсерций или делеций для введения в аминокислотную последовательность в целях сообщения конкретных свойств или структурных особенностей, которые отсутствуют в нативной последовательности, включая "гуманизирующие" замены, называется "оптимизацией последовательности". В этой связи можно обратиться к п.(у) раздела "Определения".

Предпочтительными аналогами являются такие аналоги, которые могут связываться с CXCR2 с аффинностью (обычно измеряемой и/или выражаемой как величина K_D (фактическая или кажущаяся), величина K_A (фактическая или кажущаяся), константа скорости ассоциации k_{on} и/или константа скорости диссоциации K_{off} , или альтернативно, как величина IC_{50} , также подробно описанные в настоящей заявке), которая определена в настоящем описании для бипаратопных нанотел по изобретению.

Предпочтительными аналогами также являются аналоги, которые сохраняют благоприятные свойства бипаратопных нанотел, описанных в настоящей заявке.

Кроме того, в соответствии с одним из предпочтительных аспектов настоящего изобретения указанные аналоги имеют последовательность, которая по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, а именно по меньшей мере на 95% или 99% или более идентична одной из SEQ ID NO: 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47, 61, 53, 54, 46, 69, 68, 67 или 66 бипаратопных нанотел; и/или предпочтительно имеют различия максимум в 20, предпочтительно максимум в 10, еще более предпочтительно максимум в 5, а именно в 4, 3, 2 аминокислоты или только в 1 аминокислоту (как определено в настоящей заявке) по сравнению с с одной из указанных последовательностей бипаратопных нанотел.

Кроме того, каркасные последовательности и CDR указанных аналогов предпочтительно должны соответствовать определенным в настоящем документе предпочтительным аспектам изобретения. В более широком смысле, как описано в настоящей заявке, аналоги имеют (а) Q в положении 108; и/или (b) заряженную аминокислоту или цистеиновый остаток в положении 45, предпочтительно E в положении 44, более предпочтительно E в положении 44 и R в положении 45; и/или (c) P, R или S в положении 103.

Аналоги бипаратопных V_{HH} -доменов или нанотел одного из предпочтительных классов по изобретению были гуманизированы (т.е. по сравнению с последовательностью природного нанотела). Как упоминалось выше, такое гуманизирование, по существу, включает замену одного или несколько аминокислотных остатков в последовательности природного V_{HH} аминокислотными остатками, которые присутствуют в том же самом положении V_H -домена человека, такого как V_H3 -домен человека. Примеры возможных "гуманизирующих" замен, отличающихся от замен, конкретно указанных в табл. 20, 22, 24, 26, 28 и 30, приводятся в настоящей заявке, хотя специалистами могут быть сделаны и другие комбинации гуманизирующих замен исходя из сравнения последовательности нанотела и последовательности природного V_H -домена человека и исходя из описания заявки WO 2008/020079, уже цитируемой в настоящей заявке.

Как правило, в результате гуманизации отдельные переменные домены иммуноглобулина, в част-

ности нанотела по изобретению, будут больше напоминать последовательности человека, но при этом будут сохранять благоприятные свойства описанных в настоящем документе нанотел по изобретению. В результате, такие гуманизированные нанотела могут иметь несколько преимуществ, например, они могут обладать пониженной иммуногенностью по сравнению с соответствующими природными V_{HH} -доменами. И в этом случае исходя из приведенного в настоящем документе описания и, необязательно, после нетрудоемкого рутинного экспериментирования специалист в данной области может самостоятельно вводить гуманизирующие замены или подходящие комбинации гуманизирующих замен, которые позволяют оптимизировать баланс или достичь нужного или подходящего баланса между благоприятными свойствами, сообщаемыми гуманизирующими заменами, с одной стороны, и благоприятными свойствами природных V_{HH} -доменов, с другой стороны.

Нанотела, используемые для введения в бипаратопные нанотела по изобретению, могут быть соответствующим образом гуманизированы в любом положении каркасных остатков, например в одном или нескольких положениях ключевых остатков (определенных в настоящей заявке), или в одном или нескольких положениях других каркасных остатков (т.е. неключевых остатков), или в любой их подходящей комбинации. Одной из предпочтительных гуманизирующих замен для нанотел "группы P,R,S-103" или "группы KERE" является замена Q108 на L108. Нанотела "класса GLEW" могут быть также гуманизированы путем замены Q108 на L108 при условии, что по меньшей мере один из других ключевых остатков будет содержать замену верблюжьим остатком ("кэмелизация") (как определено в настоящей заявке). Например, как упоминалось выше, гуманизированные нанотела одного из наиболее предпочтительных классов имеют последовательность GLEW или GLEW-подобную последовательность в положениях 44-47; P, R или S (в частности, R) в положении 103 и L в положении 108.

Гуманизированные и другие аналоги и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие эти аналоги, могут быть получены любым способом, известным *per se*, например, с применением одного или нескольких методов, упоминаемых на стр. 103 и 104 заявки WO 08/020079.

Как упоминалось выше, специалисту в данной области также известно, что отдельные переменные домены иммуноглобулина по изобретению (включая их аналоги) могут быть сконструированы и/или получены из последовательностей V_H человека (т.е. из аминокислотных последовательностей или соответствующих нуклеотидных последовательностей), например из последовательностей V_{H3} человека, таких как DP-47, DP-51 или DP-29, путем введения одной или нескольких кэмелизирующих замен (т.е. замены одного или нескольких аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности указанного V_H -домена человека на аминокислотные остатки, присутствующие в соответствующем положении в V_{HH} -домене) для получения последовательности нанотела по изобретению и/или для сообщения полученной таким образом последовательности нанотела благоприятных свойств. Это может быть также осуществлено с использованием различных способов и технологий, описанных в предыдущем параграфе, с использованием аминокислотной последовательности и/или нуклеотидной последовательности для V_H -домена человека в качестве исходного элемента.

Некоторые предпочтительные, но неограничивающие, кэмелизирующие замены можно найти в заявке WO 2008/020079. Также очевидно, что кэмелизирующие замены в одном или нескольких ключевых остатках, по существу, будут оказывать большее влияние на нужные свойства, чем замены в одном или нескольких других положениях аминокислот, хотя в объем настоящего изобретения входят обе эти замены и любые подходящие их комбинации. Так, например, могут быть введены одна или несколько кэмелизирующих замен, которые уже сообщают, по меньшей мере, некоторые нужные свойства, а затем могут быть введены дополнительные кэмелизирующие замены, которые будут еще больше улучшать указанные свойства и/или будут сообщать дополнительные благоприятные свойства. И в этом случае специалист в данной области, по существу, может самостоятельно определить и выбрать подходящие кэмелизирующие замены или подходящие комбинации кэмелизирующих замен исходя из приведенного в настоящем документе описания и, необязательно, после нетрудоемкого рутинного экспериментирования, которое может, например, включать введение ограниченного числа возможных кэмелизирующих замен и определение факта сообщения благоприятных свойств отдельным переменным доменам иммуноглобулина или улучшения таких свойств (по сравнению со свойствами исходного V_H -домена). Однако, как правило, предпочтительными кэмелизирующими заменами являются такие замены, при которых полученная аминокислотная последовательность, по меньшей мере, содержит: (а) Q в положении 108; и/или (б) заряженную аминокислоту или цистеиновый остаток в положении 45, предпочтительно E в положении 44, а более предпочтительно E в положении 44 и R в положении 45; и/или (с) P, R или S в положении 103, и, необязательно, одну или несколько дополнительных кэмелизирующих замен. Более предпочтительно кэмелизирующие замены должны быть введены так, чтобы это приводило к образованию одного переменного домена иммуноглобулина, используемого в настоящем изобретении, и/или его аналога (определенного в настоящей заявке), такого как гуманизированный аналог, и/или предпочтительно аналог, определенный в предыдущих параграфах.

Отдельные переменные домены иммуноглобулина, такие как нанотела, могут быть также получены из V_H -доменов путем введения замен, которые редко встречаются в природе, но тем не менее, по своей укладке имеют структурное сходство с V_H -доменом. Так, например, такими заменами могут быть, но

не ограничиваются ими, одна или несколько из нижеследующих замен, таких как замена Gly в положении 35, Ser, Val или Thr в положении 37, Ser, Thr, Arg, Lys, His, Asp или Glu в положении 39, Glu или His в положении 45, Trp, Leu, Val, Ala, Thr или Glu в положении 47, S или R в положении 50. (Barthelemy et al., J. Biol. Chem. 2008 Feb 8; 283 (6):3639-54. Epub. 2007 Nov. 28).

Настоящее изобретение также включает производные бипаратопных полипептидов по изобретению. Такие производные могут быть получены, в основном, путем модификации, в частности путем химической и/или биологической (например, ферментативной) модификации бипаратопных полипептидов по изобретению, и/или одного или нескольких аминокислотных остатков, которые образуют бипаратопные полипептиды по изобретению.

Примеры таких модификаций, а также примеры аминокислотных остатков в полипептидной последовательности, которые могут быть модифицированы таким образом (т.е. либо в белковом остове, либо, что предпочтительно, в боковой цепи), методы и технологии, которые могут быть применены для введения таких модификаций, а также возможность и преимущества применения таких модификаций очевидны для специалиста в данной области.

Например, такая модификация может включать введение (например, посредством ковалентного связывания или другим подходящим способом) одной или нескольких функциональных групп, остатков или молекул в бипаратопный полипептид по изобретению, в частности одной или нескольких функциональных групп, остатков или молекул, которые сообщают бипаратопному полипептиду по изобретению одно или несколько нужных свойств или один или несколько нужных функциональных признаков. Примеры таких функциональных групп известны специалистам.

Например, такая модификация может включать введение (например, посредством ковалентного связывания или другим подходящим способом) одной или нескольких функциональных групп, которые увеличивают время полужизни; повышают растворимость и/или абсорбцию полипептида по изобретению; снижают иммуногенность и/или токсичность полипептида по изобретению; устраняют или уменьшают какие-либо нежелательные побочные эффекты полипептида по изобретению и/или сообщают другие предпочтительные свойства и/или устраняют нежелательные свойства бипаратопных нанотел и/или полипептидов по изобретению или любую комбинацию двух или более из вышеуказанных свойств. Примеры таких функциональных групп и способы их введения известны специалистам, и такие примеры могут, в основном, включать все функциональные группы, известные специалистам, а также функциональные группы и методы, известные *per se* и применяемые для модификации фармацевтических белков, в частности для модификации антител или фрагментов антител (включая scFv и однодоменные антитела), где указанные функциональные группы и методы описаны, например, в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980). Такие функциональные группы могут быть непосредственно присоединены (например, ковалентно) к бипаратопному полипептиду по изобретению, либо они могут быть присоединены, но необязательно, посредством подходящего линкера или спейсера, как известно специалистам.

Другая, обычно менее предпочтительная модификация содержит N-связанное или O-связанное гликозилирование, обычно осуществляемое в процессе котрансляционной и/или посттрансляционной модификации в зависимости от типа клетки-хозяина, используемой для экспрессии бипаратопного нанотела или полипептида по изобретению.

Другая модификация может содержать введение одной или нескольких детектируемых меток или других сигнал-генерирующих групп или молекул, в зависимости от цели применения меченого полипептида или нанотела. Подходящие метки и способы их присоединения, использования и детектирования известны специалистам, и такими метками являются, но не ограничиваются ими, флуоресцентные метки, фосфоресцирующие метки, хемилюминесцентные метки, биолюминесцентные метки, радиоактивные изотопы, металлы, хелатные комплексы с металлами, катионы металлов, хромофоры и ферменты, например, упомянутые на стр. 109 заявки WO 08/020079. Специалистам в данной области известны и другие подходящие метки, и такими метками являются, например, молекулы, которые могут быть детектированы с помощью ЯМР-спектроскопии или резонансной спектроскопии методом электрораспыления.

Такие меченные бипаратопные нанотела и полипептиды по изобретению могут быть использованы, например, для проведения анализов *in vitro*, *in vivo* или *in situ* (включая иммуноанализы, известные *per se*, такие как ELISA, РИА, ЭИА и другие "сэндвич-анализы" и т.п.), а также для диагностики и визуализации *in vivo* в зависимости от выбора конкретной метки.

Как очевидно для специалиста в данной области, другая модификация может включать введение хелатообразующей группы, например, для образования хелатного комплекса с металлами или катионами металлов, описанными выше. Подходящими хелатообразующими группами являются, но не ограничиваются ими, диэтиленetriаминпентауксусная кислота (DTPA) или этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA).

Другая модификация может содержать введение функциональной группы, которая представляет собой одну часть конкретной связывающей пары, такой как связывающая пара "биотин-(стрепт)авидин". Такая функциональная группа может быть использована для связывания бипаратопного полипептида по изобретению или нанотела по изобретению с другим белком, полипептидом или химическим соединени-

ем, которые связываются с другой половиной связывающей пары, т.е. с образованием связывающей пары. Например, бипаратопное нанотело по изобретению может быть конъюгировано с биотином и связано с другим белком, полипептидом, соединением или носителем, конъюгированным с авидином или со стрептавидином. Например, такое конъюгированное бипаратопное нанотело может быть использовано в качестве репортера, например, в системе диагностики, в которой детектируемый сигнал-генерирующий агент конъюгирован с авидином или со стрептавидином. Такие связывающие пары могут быть также использованы, например, для связывания бипаратопного нанотела по изобретению с носителем, включая носители, подходящие для их использования в фармацевтике. Одним из неограничивающих примеров являются липосомные препараты, описанные Cao и Suresh, *Journal of Drug Targeting*, 8, 4, 257 (2000). Такие связывающие пары могут быть также использованы для присоединения терапевтически активного средства к нанотелу по изобретению.

Для применения в некоторых целях, в частности, для уничтожения клеток, экспрессирующих CXCR2-мишень, против которой направлены бипаратопные полипептиды или отдельные вариабельные домены бипаратопного иммуноглобулина по изобретению (например, для лечения рака), или для снижения или замедления роста и/или пролиферации таких клеток, бипаратопные полипептиды по изобретению могут быть также присоединены к токсину или к токсическому остатку или к токсической части. Примерами токсических частей, соединений или остатков, которые могут быть присоединены к бипаратопному полипептиду по изобретению с получением, например, цитотоксического соединения, являются токсические части, соединения или остатки, которые известны специалистам и описаны в предшествующих работах, цитируемых выше и/или в подробном описании настоящей заявки. Одним из примеров является так называемая технология ADEPT™, описанная в WO 03/055527.

Специалистам известны и другие возможные химические и ферментативные модификации. Такие модификации могут быть также введены в исследовательских целях (например, для исследования взаимосвязи функции и активности). Их описание можно найти, например, в публикации Lundblad and Bradshaw, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 26, 143-151 (1997).

Предпочтительными производными являются такие производные, которые связываются с CXCR2 с аффинностью (обычно измеряемой и/или выражаемой как величина K_D (фактическая или кажущаяся), величина K_A (фактическая или кажущаяся), константа скорости ассоциации k_{on} и/или константа скорости диссоциации k_{off} , или альтернативно, как величина IC_{50} , также подробно описанные в настоящей заявке), которая определена в настоящем описании для бипаратопных нанотел по изобретению.

Как было упомянуто выше, настоящее изобретение также относится к белкам или полипептидам, которые, по существу, состоят по меньшей мере из одного бипаратопного полипептида по изобретению или содержат указанный полипептид. Термин "по существу, состоит из" означает, что аминокислотная последовательность полипептида по изобретению либо является точно такой же, как аминокислотная последовательность бипаратопного полипептида по изобретению, либо соответствует аминокислотной последовательности такого полипептида по изобретению, которая имеет ограниченное число аминокислотных остатков, а именно 1-20 аминокислотных остатков, например 1-10 аминокислотных остатков, а предпочтительно 1-6 аминокислотных остатков, а именно 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных остатков, добавленных к аминоконцу, к карбоксиконцу или к аминоконцу и к карбоксиконцу аминокислотной последовательности бипаратопного полипептида.

Указанные аминокислотные остатки могут изменять, модифицировать или как-либо иначе влиять на (биологические) свойства полипептида, а могут и не обладать таким действием, а также они могут сообщать, а могут и не сообщать дополнительные функциональные свойства. Например, такие аминокислотные остатки

могут включать N-концевой остаток Met, например остаток, образующийся в результате экспрессии в гетерологичной клетке-хозяине или в гетерологичном организме-хозяине;

могут образовывать сигнальную последовательность или лидерную последовательность, которая обеспечивает секрецию бипаратопного полипептида из клетки-хозяина после синтеза. Подходящие секреторные лидерные пептиды известны специалистам и более подробно описаны ниже. Обычно такая лидерная последовательность может быть присоединена к N-концу бипаратопного полипептида;

могут образовывать последовательность или сигнал, которые позволяют бипаратопному полипептиду направляться к конкретным органам, тканям, клеткам или частям или компартментам клеток, и/или проникать, или проходить в них, и/или которые позволяют бипаратопному полипептиду проникать или переходить через биологический барьер, такой как клеточная мембрана, клеточный слой, такой как слой эпителиальных клеток, опухоль, включая солидные опухоли, или гематоэнцефалический барьер. Примеры таких аминокислотных последовательностей известны специалистам и упоминаются в параграфе (с) на стр. 112 заявки WO 08/020079;

могут образовывать "метку", например аминокислотную последовательность или остаток, которые позволяют осуществлять очистку бипаратопного нанотела или облегчают такую очистку, например, с использованием способов на основе аффинности к указанной последовательности или к указанному остатку. Затем указанные последовательности или остатки могут быть удалены (например, путем химического или ферментативного расщепления) с получением последовательности бипаратопного полипепти-

да (для этих целей, метка может быть, но необязательно, присоединена к последовательности бипаратопного полипептида посредством отщепляемой линкерной последовательности, либо она может содержать отщепляемый мотив). Некоторыми предпочтительными, но неограничивающими примерами таких остатков являются полигистидиновые остатки, глутатионовые остатки и тус-метка (см., например, SEQ ID NO: 31 в заявке WO 06/12282);

могут представлять собой одни или несколько аминокислотных остатков, которые могут быть функционализированы и/или могут служить сайтом присоединения функциональных групп. Подходящие аминокислотные остатки и функциональные группы известны специалистам, и такими остатками и группами являются, но не ограничиваются ими, аминокислотные остатки и функциональные группы, упомянутые в настоящем документе при описании производных бипаратопных полипептидов или нанотел по изобретению.

В другом аспекте изобретения бипаратопный полипептид по изобретению содержит бипаратопное нанотело по изобретению, которое слито по меньшей мере с одним другим пептидом или полипептидом у аминоконца, у карбоксиконца или у аминоконца и у карбоксиконца, с получением слитого белка, содержащего указанное бипаратопное нанотело по изобретению и один или несколько других пептидов или полипептидов. Такой слитый полипептид также называется в настоящем документе "слитым нанотелом".

Предпочтительно, чтобы такой дополнительный пептид или полипептид сообщал бипаратопному нанотелу или полипептиду по изобретению одно или несколько нужных свойств или функциональных признаков.

Например, дополнительный пептид или полипептид может также вводить дополнительный сайт связывания, где указанный сайт связывания может непосредственно связываться с любым нужным белком, полипептидом, антигеном, антигенной детерминантой или эпитопом (включая, но не ограничиваясь ими, те же самые белки, полипептиды, антигены, антигенные детерминанты или эпитопы, против которых направлен бипаратопный полипептид по изобретению, или другие белки, полипептиды, антигены, антигенные детерминанты или эпитопы).

Примеры таких пептидов или полипептидов известны специалистам и могут, по существу, включать все аминокислотные последовательности, используемые для получения слитых пептидов на основе стандартных антител и их фрагментов (включая, но не ограничиваясь ими, scFv и однодоменные антитела). Их описание можно найти, например, в публикации Holliger and Hudson, *Nature Biotechnology*, 23, 9, 1126-1136 (2005).

Например, такой пептид или полипептид может представлять собой аминокислотную последовательность, которая увеличивает время полужизни; повышает растворимость или абсорбцию; снижает иммуногенность или токсичность; устраняет или уменьшает нежелательные побочные эффекты; и/или сообщает другие предпочтительные свойства полипептидам по изобретению, и/или устраняет нежелательные свойства полипептидов по изобретению по сравнению с полипептидом по изобретению *per se*. Некоторыми неограничивающими примерами таких пептидов и полипептидов являются сывороточные белки, такие как альбумин сыворотки человека (см., например, WO 00/27435) или гаптеносные молекулы (например, гаптены, распознаваемые антителами, присутствующими в кровотоке, см., например, WO 98/22141).

В частности, в литературе было описано, что фрагменты, связывающие иммуноглобулины (такие как V_H-домены) с сывороточным альбумином или с его фрагментами, могут быть использованы для увеличения времени полужизни. Их описание можно найти в WO 00/27435 и WO 01/077137. В соответствии с настоящим изобретением бипаратопные полипептиды, а предпочтительно бипаратопное нанотело по изобретению, связывается с сывороточным альбумином (или с его подходящим фрагментом) либо непосредственно, либо посредством подходящего линкера, в частности подходящего пептидного линкера, в результате чего полипептид по изобретению может экспрессироваться как генетический гибрид (белок). В одном из конкретных аспектов изобретения бипаратопное нанотело по изобретению может быть присоединено к фрагменту сывороточного альбумина, который содержит, по меньшей мере, домен III сывороточного альбумина или его части. Их описание можно найти, например, в заявке WO 07/112940, Ablynx N.V.

Альтернативно, как уже обсуждалось выше, дополнительный пептид или полипептид может вводить дополнительный сайт связывания или связывающую единицу, которые непосредственно связываются с сывороточным белком (таким как, например, альбумин сыворотки человека или другой сывороточный белок, такой как IgG), что приводит к увеличению времени полужизни в сыворотке. Такими аминокислотными последовательностями являются, например, описанные ниже нанотела, а также небольшие пептиды и связывающие белки, описанные в заявках WO 91/01743, WO 01/45746 и WO 02/076489, и dAb, описанные в заявках WO 03/002609 и WO 04/003019. Их описание можно также найти в публикации Harmsen et al., *Vaccine*, 23 (41); 4926-42, 2005, а также в EP 0368684, в заявках WO 08/028977, WO 08/043821, WO 08/043822, Ablynx N.V. и в предварительной заявке США, Ablynx N.V., озаглавленной "Peptides capable of binding to serum proteins" и поданной 5 декабря 2006 г. (см. также PCT/EP 2007/063348).

Такие пептиды или полипептиды могут быть, в частности, направлены против сывороточного альбумина (а более конкретно, против альбумина сыворотки человека) и/или против IgG (а более конкретно, против IgG человека). Например, такими аминокислотными последовательностями могут быть аминокислотные последовательности, направленные непосредственно против сывороточного альбумина (человека), и аминокислотные последовательности, которые могут связываться с аминокислотными остатками на сывороточном альбумине (человека), и которые не участвуют в связывании сывороточного альбумина с FcRn (см., например, WO 06/0122787), и/или аминокислотные последовательности, которые способны связываться с аминокислотными остатками на сывороточном альбумине, и которые не образуют часть домена III сывороточного альбумина (см., например, WO 06/0122787); аминокислотные последовательности, которые имеют увеличенное время полужизни или могут сообщать увеличенное время полужизни (см., например, WO 08/028977, Ablynx N.V.); аминокислотные последовательности, которые направлены против альбумина сыворотки человека и которые перекрестно реагируют с сывороточным альбумином, происходящим от млекопитающих по меньшей мере одного вида, в частности от приматов по меньшей мере одного вида (таких как, но не ограничиваясь ими, обезьяны, принадлежащие к роду *Macaca* (такие как, в частности, собакоподобные обезьяны (*Macaca fascicularis*) и/или макак-резус (*Macaca mulatta*)) и павианов (*Papio ursinus*)), см. также WO 08/028977; аминокислотные последовательности, которые могут связываться с сывороточным альбумином независимо от pH (см., например, заявку WO 08/043821, Ablynx N.V., озаглавленную "Amino acid sequences that bind to serum proteins in a manner that is essentially independent of the pH, compounds comprising the same, and uses thereof") и/или аминокислотные последовательности, которые связываются в зависимости от определенных условий (см., например, заявку WO 08/043822, Ablynx N.V., озаглавленную "Amino acid sequences that bind to a desired molecule in a conditional manner").

В соответствии с другим аспектом изобретения одна или несколько дополнительных пептидных, полипептидных или белковых последовательностей могут содержать одну или несколько частей, один, или несколько фрагментов или один или несколько доменов стандартных 4-цепочечных антител (в частности, антител человека) и/или антител с тяжелой цепью. Например, бипаратопное нанотело по изобретению может связываться со стандартным (предпочтительно человека) V_H - или V_L -доменом или с природным или синтетическим аналогом V_H - или V_L -домена, необязательно, посредством линкерной последовательности (включая, но не ограничиваясь ими, другие (одно)доменные антитела, такие как dAb, описанные Ward et al.), хотя такое антитело обычно является менее предпочтительным.

Бипаратопный полипептид или бипаратопное нанотело может также связываться с одним или несколькими (предпочтительно человека) C_{H1} -, C_{H2} - и/или C_{H3} -доменами, необязательно, посредством линкерной последовательности. Например, бипаратопное нанотело, связанное с подходящим C_{H1} -доменом, может быть, например, использовано вместе с подходящими легкими цепями для получения фрагментов антитела/структур, которые аналогичны стандартным Fab-фрагментам или $F(ab')_2$ -фрагментам, но в которых один или (в случае $F(ab')_2$ -фрагмента) один или оба стандартных V_H -домена были заменены бипаратопным нанотелом по изобретению. Кроме того, два бипаратопных полипептида могут быть связаны с C_{H3} -доменом (необязательно, посредством линкера) с получением конструкции, имеющей увеличенное время полужизни *in vivo*.

В соответствии с одним из конкретных аспектов полипептида по изобретению один или несколько бипаратопных полипептидов или одно или несколько бипаратопных нанотел по изобретению могут быть связаны (необязательно, посредством подходящего линкера или шарнирной области) с одним или несколькими константными доменами (например, с 2 или 3 константными доменами, которые могут быть использованы как часть Fc-фрагмента/для образования Fc-фрагмента), с Fc-частью и/или с одной или несколькими частями, фрагментами или доменами антитела, которые сообщают полипептиду по изобретению одну или несколько эффекторных функций, и/или которые могут сообщать этому полипептиду способность связываться с одним или несколькими Fc-рецепторами. Например, один или несколько дополнительных пептидов или полипептидов, используемых в этих целях, но не ограничиваясь ими, могут содержать один или несколько C_{H2} - и/или C_{H3} -доменов антитела, например антитела с тяжелой цепью (как описано в настоящей заявке), а более предпочтительно стандартного 4-цепочечного антитела человека; и/или они могут образовывать (часть) Fc-области, например, происходящей от IgG (например, от IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), от IgE или от другого Ig человека, такого как IgA, IgD или IgM. Например, в WO 94/04678 описаны антитела с тяжелой цепью, содержащие V_{HH} -домен верблюда или его гуманизованное производное (т.е. нанотело), в которых верблюжьих C_{H2} - и/или C_{H3} -домены были заменены C_{H2} - и C_{H3} -доменами человека с образованием иммуноглобулина, который состоит из 2 тяжелой цепей, каждая из которых содержит нанотело и C_{H2} - или C_{H3} -домены человека (но не C_{H1} -домен), где указанный иммуноглобулин обладает эффекторной функцией, сообщаемой C_{H2} - или C_{H3} -доменами, и где указанный иммуноглобулин может функционировать в отсутствие каких-либо легких цепей. Другие аминокислотные последовательности, которые могут быть соответствующим образом связаны с нанотелами по изобретению для сообщения им эффекторной функции, известны специалистам и могут быть выбраны в соответствии с их желательными эффекторными функциями. Описание этих последовательностей можно найти, например, в WO 04/058820, WO 99/42077, WO 02/056910 и WO 05/017148, а также в публикациях

Holliger и Hudson, см. выше. Связывание полипептида, например нанотела по изобретению, с Fc-частью может также приводить к увеличению времени полужизни в отличие от соответствующего полипептида по изобретению. Для некоторых целей использование Fc-части и/или константных доменов (т.е. C_H2-и/или C_H3-доменов), которые сообщают увеличенное время полужизни, но не обладают какой-либо биологически значимой эффекторной функцией, может также оказаться желательным или даже предпочтительным. Другие подходящие конструкции, содержащие один или несколько бипаратопных полипептидов, таких как нанотела, и один или несколько константных доменов с увеличенным временем полужизни *in vivo* известны специалистам и могут, например, включать два нанотела, связанных с C_H3-доменом, необязательно, посредством линкерной последовательности. Как правило, любой слитый белок или любые производные с увеличенным временем полужизни предпочтительно имеют молекулярную массу более чем 50 кД, т.е. предельную величину для абсорбции в почках.

В другом конкретном, но не ограничивающем аспекте изобретения для получения полипептида по изобретению одна или несколько аминокислотных последовательностей по изобретению могут быть присоединены (необязательно, посредством подходящего линкера или подходящей шарнирной области) к природным, синтетическим или полусинтетическим константным доменам (или их аналогам, вариантам, мутантам, частям или фрагментам), которые имеют пониженную тенденцию (или, по существу, не обнаруживают такой тенденции) к самосборке в димеры (т.е. по сравнению с константными доменами, которые обычно присутствуют в стандартных 4-цепочечных антителах). Такие мономерные (т.е. не самоассоциирующиеся) варианты Fc-цепи или их фрагменты известны специалистам в данной области. Так, например, в публикации Helm et al., J. Biol. Chem. 1996 271 7494, описаны варианты мономерной Fc-цепи, которые могут быть использованы в полипептидных цепях по изобретению.

Кроме того, такие варианты мономерной Fc-цепи являются предпочтительными, поскольку они сохраняют способность связываться с комплементом или с релевантным(и) Fc-рецептором(ами) (в зависимости от Fc-части, от которой они происходят) и/или поскольку они сохраняют некоторые или все эффекторные функции Fc-части, от которой они происходят (или на пониженном уровне, но все же достаточном для осуществления нужных целей). Альтернативно, в такой полипептидной цепи по изобретению мономерная Fc-цепь может быть также использована для сообщения полипептидной цепи увеличенного времени полужизни, где указанная мономерная Fc-цепь может также не обладать или почти не обладать эффекторными функциями.

Дополнительные пептиды или полипептиды могут также образовывать сигнальную последовательность или лидерную последовательность, которая направляет секрецию бипаратопного нанотела или полипептида по изобретению из клетки-хозяина после его синтеза (например, с образованием пре-, про- или препроформы полипептида по изобретению в зависимости от типа клетки-хозяина, используемой для экспрессии полипептида по изобретению).

Дополнительный пептид или полипептид может также образовывать последовательность или сигнал, которые позволяют бипаратопному нанотелу или полипептиду по изобретению направляться к конкретным органам, тканям, клеткам или частям, или компартментам клеток, и/или проникать или проходить в них, и/или которые позволяют бипаратопному нанотелу или полипептиду по изобретению проникать или переходить через биологический барьер, такой как клеточная мембрана, клеточный слой, такой как слой эпителиальных клеток, опухоль, включая солидные опухоли, или через гематоэнцефалический барьер. Подходящие примеры таких аминокислотных последовательностей известны специалистам, и такими аминокислотными последовательностями являются, например, но не ограничиваются ими, аминокислотные последовательности, упоминаемые на стр. 118 заявки WO 08/020079. Для применения в некоторых целях, в частности для уничтожения клеток, экспрессирующих CXCR2-мишень, против которой направлены бипаратопные полипептиды по изобретению (например, для лечения рака), или для снижения или замедления роста и/или пролиферации таких клеток, бипаратопные полипептиды по изобретению могут быть также присоединены к (cito)токсическому белку или полипептиду. Примеры таких токсических белков и полипептидов, которые могут быть присоединены к нанотелу по изобретению с получением, например, цитотоксического полипептида по изобретению, известны специалистам и описаны в предшествующих работах, цитируемых выше и/или в подробном описании настоящей заявки. Одним из примеров является так называемая технология ADEPT™, описанная в WO 03/055527.

В соответствии с одним необязательным и неограничивающим аспектом изобретения, указанные один или несколько дополнительных пептидов, или полипептидов содержат по меньшей мере одно дополнительное нанотело, а поэтому представляют собой полипептид по изобретению, который содержит по меньшей мере три, например четыре, пять или более нанотел, где указанные нанотела могут быть связаны, но необязательно, посредством одной или нескольких линкерных последовательностей (как определено в настоящей заявке).

И наконец, в объем настоящего изобретения входят бипаратопные полипептиды по изобретению, которые могут содержать два или более нанотел и один или несколько дополнительных пептидов или полипептидов (как упоминается в настоящей заявке).

Описание поливалентных и мультиспецифических полипептидов, содержащих два или более V_H-доменов, и их получения можно также найти в публикациях Conrath et al., J. Biol. Chem., Vol. 276, 10.

7346-7350, 2001; Muyldermans, *Reviews in Molecular Biotechnology* 74 (2001), 277-302; а также, например, в WO 96/34103 и WO 99/23221. Некоторые другие примеры некоторых специфических, мультиспецифических и/или поливалентных полипептидов по изобретению можно найти в заявках Ablynx N.V., упоминаемых в настоящей заявке.

Один из предпочтительных примеров мультиспецифического полипептида по изобретению включает по меньшей мере одно бипаратопное нанотело по изобретению и по меньшей мере одно нанотело, которое сообщает увеличенное время полужизни. Такими нанотелами могут быть, например, нанотела, которые направлены против сывороточного белка, в частности сывороточного белка человека, такого как альбумин сыворотки человека, белок, связывающийся с тироксином, трансферин (человека), фибриноген, иммуноглобулин, такой как IgG, IgE или IgM, или против одного из сывороточных белков, перечисленных в WO 04/003019. Среди этих нанотел нанотела, которые могут связываться с сывороточным альбумином (в частности, с альбумином сыворотки человека) или с IgG (в частности, с IgG человека, см., например, описание нанотела V_H-1 в публикации Muyldermans, см. выше), являются особенно предпочтительными (хотя, например, для проведения экспериментов на мышах или приматах могут быть использованы нанотела, направленные против альбумина сыворотки мыши (MSA) или сывороточного альбумина от указанного примата, соответственно, или перекрестно связывающиеся с указанными альбуминами. Однако для применения в фармацевтике обычно предпочтительными являются нанотела, направленные против альбумина сыворотки человека или против IgG человека). Нанотелами, которые сообщают увеличенное время полужизни, и которые могут быть использованы в полипептидах по изобретению, являются нанотела, направленные против сывороточного альбумина, где указанные нанотела описаны в WO 04/041865, WO 06/122787 и в других патентных заявках, Ablynx N.V., таких как патентные заявки, указанные выше.

Например, некоторыми предпочтительными нанотелами, которые сообщают увеличенное время полужизни и которые могут быть использованы в настоящей заявке, являются нанотела, которые могут связываться с аминокислотными остатками на сывороточном альбумине (человека) и которые не участвуют в связывании сывороточного альбумина с FcRn (см., например, WO 06/0122787); нанотела, которые способны связываться с аминокислотными остатками на сывороточном альбумине и которые не образуют часть домена III сывороточного альбумина (см., например, WO 06/0122787); нанотела, которые имеют увеличенное время полужизни или могут сообщать увеличенное время полужизни (см., например, упоминаемую в настоящем документе заявку WO 08/028977, Ablynx N.V.); нанотела, которые направлены против альбумина сыворотки человека и которые перекрестно реагируют с сывороточным альбумином, происходящим от млекопитающих по меньшей мере одного вида, в частности от приматов по меньшей мере одного вида (таких как, но не ограничивающихся ими, обезьяны, принадлежащие к роду *Macaca* (такие как, в частности, собакоподобные обезьяны (*Macaca fascicularis*) и/или макак-резус (*Macaca mulatta*) и павианов (*Papio ursinus*)) (см. например, WO 08/028977, Ablynx N.V.); нанотела, которые могут связываться с сывороточным альбумином независимо от pH (см., например, заявку WO 2008/043821, Ablynx N.V., упоминаемую в настоящей заявке) и/или нанотела, которые связываются в зависимости от определенных условий (см., например, заявку WO 08/043822, Ablynx N.V.).

Некоторыми особенно предпочтительными нанотелами, которые сообщают увеличенное время полужизни и которые могут быть использованы в полипептидах по изобретению, являются нанотела ALB-1 - ALB-10, описанные в WO 06/122787 (см. табл. II и III), из которых особенно предпочтительным является ALB-8 (SEQ ID NO: 62 в WO 06/122787).

В соответствии с конкретным аспектом изобретения полипептиды по изобретению содержат помимо двух или более нанотел по меньшей мере одно нанотело, направленное против альбумина сыворотки человека.

Другими дополнительными пептидами или полипептидами, которые могут быть добавлены к бипаратопным полипептидам по изобретению или которые могут быть присоединены к бипаратопным полипептидам по изобретению или связаны с этими полипептидами, являются полимеры, состоящие из пролина, аланина и серина (последовательности PAS). Последовательности PAS могут состоять из 200-600 остатков и способствуют резкому увеличению гидродинамического объема, что приводит к увеличению времени полужизни в плазме. Время полужизни в плазме бипаратопных полипептидов по изобретению может быть также увеличено путем слияния с полипептидом, состоящим из 864 аминокислот и обозначаемым XTEN, как описано Schellenbrger et al., (2009), *Nature Biotechnology* 27, No 12, p. 1186-1190.

Как правило, любые полипептиды по изобретению с увеличенным временем полужизни, которые содержат одно или несколько бипаратопных нанотел по изобретению, и любые производные бипаратопных нанотел по изобретению или указанных полипептидов с увеличенным временем полужизни предпочтительно имеют время полужизни, которое по меньшей мере в 1,5 раза, предпочтительно по меньшей мере в 2 раза, а именно по меньшей мере в 5 раз, например по меньшей мере в 10 раз или более чем в 20 раз превышает время полужизни соответствующего нанотела по изобретению *per se*. Например, такое производное или полипептиды с увеличенным временем полужизни имеют время полужизни, которое по меньшей мере более чем на 1 ч, предпочтительно более чем на 2 ч, более предпочтительно более чем на 6 ч, а именно более чем на 12 ч или даже более чем на 24, 48 или 72 ч превышает время полужизни соот-

ветствующего нанотела по изобретению *per se*.

В предпочтительном, но неограничивающем аспекте изобретения такие производные или полипептиды могут иметь время полужизни в сыворотке человека, составляющее по меньшей мере приблизительно 12 ч, предпочтительно по меньшей мере 24 ч, более предпочтительно по меньшей мере 48 ч, а еще более предпочтительно по меньшей мере 72 ч или более. Например, такие производные или полипептиды могут иметь время полужизни, составляющее по меньшей мере 5 дней (а именно, приблизительно 5-10 дней), предпочтительно по меньшей мере 9 дней (а именно, приблизительно 9-14 дней), более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 10 дней (а именно, приблизительно 10-15 дней), или по меньшей мере приблизительно 11 дней (а именно, приблизительно 11-16 дней), более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 12 дней (а именно, приблизительно 12-18 дней или более) или более чем 14 дней (а именно, приблизительно 14-19 дней).

Другой предпочтительный, но неограничивающий пример мультиспецифического полипептида по изобретению содержит по меньшей мере одно бипаратопное нанотело по изобретению и по меньшей мере одно нанотело, которое направляет полипептид по изобретению к конкретным органам, тканям, клеткам или частям или компартаментам клеток, и/или позволяет такому полипептиду по изобретению проникать или проходить в них, и/или которые позволяют нанотелу проникать или проходить через биологический барьер, такой как клеточная мембрана, клеточный слой, такой как слой эпителиальных клеток, опухоль, включая солидные опухоли, или через гематоэнцефалический барьер. Примерами таких нанотел являются нанотела, которые направлены на специфические белки клеточной поверхности, маркеры или эпитопы нужных органов, тканей или клеток (например, маркеры клеточной поверхности, связанные с опухолевыми клетками), и фрагменты однодоменных антител, которые нацелены на головной мозг и описаны в WO 02/057445 и WO 06/040153, из которых предпочтительными примерами являются FC44 (SEQ ID NO: 189 в заявке WO 06/040153) и FC5 (SEQ ID NO: 190 в заявке WO 06/040154).

В полипептидах по изобретению два или более нанотел и один или несколько полипептидов могут быть непосредственно связаны друг с другом (например, как описано в WO 99/23221), и/или они могут быть связаны друг с другом посредством одного или нескольких подходящих спейсеров или линкеров, или любых их комбинаций.

В соответствии с одним из аспектов изобретения полипептид по изобретению присутствует, по существу, в выделенной форме, как определено в настоящей заявке.

Аминокислотные последовательности, бипаратопные нанотела, полипептиды и нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть получены известным методом *per se*, что будет очевидным для специалистов из подробного описания настоящей заявки. Например, бипаратопные нанотела и полипептиды по изобретению могут быть получены любым известным методом *per se*, применяемым для получения антител, в частности для получения фрагментов антител (включая, но не ограничиваясь ими, (одно)доменные антитела и scFv-фрагменты). Некоторыми предпочтительными, но неограничивающимися методами получения аминокислотных последовательностей, нанотел, полипептидов и нуклеиновых кислот являются методы и технологии, описанные в настоящей заявке.

Как очевидно для специалиста в данной области, один особенно подходящий способ получения бипаратопного нанотела и/или полипептида по изобретению, по существу, включает стадии:

i) экспрессия в подходящей клетке-хозяине или в подходящем организме-хозяине (также называемыми в настоящем документе "хозяином по изобретению") или в другой подходящей экспрессионной системе, нуклеиновой кислоты, которая кодирует указанное бипаратопное нанотело или указанный полипептид по изобретению (также называемой в настоящем документе "нуклеиновой кислотой по изобретению"), и необязательно

ii) выделение и/или очистка полученного таким образом указанного бипаратопного нанотела или полипептида по изобретению.

В частности, способ может включать стадии:

i) культивирование и/или поддержание хозяина по изобретению в условиях, при которых указанный хозяин по изобретению будет экспрессировать и/или продуцировать по меньшей мере одно бипаратопное нанотело и/или по меньшей мере один полипептид по изобретению, и необязательно

ii) выделение и/или очистка полученного таким образом бипаратопного нанотела или полипептида по изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид по изобретению (или его подходящий фрагмент). Такая нуклеиновая кислота также называется в настоящем документе "нуклеиновой кислотой по изобретению" и может иметь форму генетической конструкции, более подробно описанной ниже.

В своих предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, выбранную из группы аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 25-43, 90 и SEQ ID NO: 213-219 и относящихся к конкретным специфическим нанотелам, представленным в табл. 9 и 32. Альтернативно, молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению включают молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие конструкции поливалентных и бипаратопных нанотел SEQ ID NO:44-69. Кроме того, молекулы нуклеиновой кислоты по

изобретению содержат молекулы с последовательностями нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 192-211, относящимися к нанотелам, идентифицированным в табл. 18.

Нуклеиновая кислота по изобретению может иметь форму одноцепочечной или двухцепочечной ДНК или РНК, предпочтительно двухцепочечной ДНК. Например, нуклеотидными последовательностями по изобретению могут быть геномная ДНК, кДНК или синтетическая ДНК (такая как ДНК с частотой встречаемости кодонов, которая была конкретно адаптирована для экспрессии в рассматриваемой клетке-хозяине или в организме-хозяине).

В соответствии с одним из аспектов изобретения нуклеиновая кислота по изобретению присутствует, по существу, в выделенной форме, как определено в настоящей заявке.

Нуклеиновая кислота по изобретению может также иметь форму вектора, такого как плаزمид, космида или YAC, либо она может присутствовать в указанном векторе и/или она может быть частью такого вектора, и в этом случае, нуклеиновая кислота может присутствовать, по существу, в выделенной форме.

Нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть получены или продуцированы способом, известным *per se*, исходя из имеющейся в настоящем документе информации об аминокислотных последовательностях полипептидов по изобретению, и/или они могут быть выделены из подходящего природного источника. Для получения аналогов нуклеотидные последовательности, кодирующие природные V_{HH} -домены, могут быть, например, подвергнуты сайт-направленному мутагенезу в целях конструирования нуклеиновой кислоты по изобретению, кодирующей указанный аналог. Кроме того, как очевидно для специалиста в данной области, для получения нуклеиновой кислоты по изобретению несколько нуклеотидных последовательностей, таких как по меньшей мере одна нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид по изобретению, и, например, нуклеиновые кислоты, кодирующие один или несколько линкеров, могут быть присоединены друг к другу соответствующим образом.

Способы получения нуклеиновых кислот по изобретению известны специалистам и могут включать, например, но не ограничиваются ими, автоматизированный синтез ДНК; сайт-направленный мутагенез; объединение двух или более природных и/или синтетических последовательностей (или их двух или более частей); введение мутаций, способствующих экспрессии усеченного продукта экспрессии; введение одного или нескольких рестрикционных сайтов (например, для создания кластеров и/или областей, которые могут быть легко гидролизованы и/или лигированы под действием подходящих рестриктирующих ферментов) и/или введение мутаций посредством ПЦР-реакции с использованием одного или более "несоответствующих" праймеров с использованием, например, последовательности природного CXCR2 в качестве матрицы. Эти и другие методы известны специалистам и описаны в стандартных руководствах, таких как руководства Sambrook et al. и Ausubel et al., упомянутые выше, а также в нижеприведенных примерах.

Нуклеиновая кислота по изобретению может также иметь форму генетической конструкции, может присутствовать в генетической конструкции и/или может быть частью генетической конструкции. Такие генетические конструкции обычно содержат по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту по изобретению, которая присоединена, но необязательно, к одному или нескольким элементам генетической конструкции, известным *per se*, таким как, например, один или несколько подходящих регуляторных элементов (таких как подходящий(ие) промотор(ы), энхансер(ы), терминатор(ы) и т.п.), и к другим элементам описанных в настоящем документе генетических конструкций. Такие генетические конструкции, содержащие по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту по изобретению, называются в настоящем документе "генетическими конструкциями по изобретению".

Генетическими конструкциями по изобретению могут быть ДНК или РНК предпочтительно двухцепочечная ДНК. Генетические конструкции по изобретению могут также присутствовать в форме, подходящей для трансформации рассматриваемой клетки-хозяина или рассматриваемого организма-хозяина; в форме, подходящей для интеграции в геномную ДНК рассматриваемой клетки-хозяина или в форме, подходящей для независимой репликации, сохранения и/или наследования в рассматриваемом организме-хозяине. Так, например, генетические конструкции по изобретению могут иметь форму вектора, такого как, например, плазмид, космида, YAC, вирусный вектор или транспозон. В частности, указанным вектором может быть вектор экспрессии, т.е. вектор, который стимулирует экспрессию *in vitro* и/или *in vivo* (например, в подходящей клетке-хозяине, в подходящем организме-хозяине и/или в подходящей экспрессионной системе).

В предпочтительном, но неограничивающем аспекте изобретения генетическая конструкция по изобретению содержит:

- i) по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту по изобретению, функционально присоединенную
- ii) к одному или нескольким регуляторным элементам, таким как промотор. и, необязательно, к подходящему терминатору; а также, но необязательно

- iii) к одному или нескольким другим элементам генетических конструкций, известных *per se*;

где термины "функционально присоединенный" и "функционально связанный" имеют значения, приведенные на стр. 131-134 заявки WO 08/020079; термины "регуляторные элементы", "промотор", "терминатор" и "дополнительные элементы" описаны на стр. 131-134 заявки WO 08/020079; а генетиче-

ские конструкции подробно описаны на стр. 131-134 заявки WO 08/020079.

Нуклеиновые кислоты по изобретению и/или генетические конструкции по изобретению могут быть использованы для трансформации клетки-хозяина или организма-хозяина, т.е. для экспрессии и/или получения бипаратопного нанотела или полипептида по изобретению. Подходящие хозяева или клетки-хозяева известны специалистам, и ими могут быть, например, любые подходящие клетки или клеточные линии грибов, прокариотов или эукариотов или любые подходящие микроорганизмы, такие как грибы, прокариоты или эукариоты, например, описанные на стр. 134 и 135 заявки WO 08/020079, а также все другие хозяева или клетки-хозяева, известные *per se* и используемые для экспрессии и получения антител и фрагментов антител (включая, но не ограничиваясь ими, (одно)доменные антитела и scFv-фрагменты), известных специалистам. Их описание можно найти в цитируемой выше литературе, а также, например, в заявках WO 94/29457; WO 96/34103; WO 99/42077; в публикациях Frenken et al., (1998), см. выше; Riechmann and Muyldermans, (1999), см. выше; van der Linden, (2000), см. выше; Thomassen et al., (2002), см. выше; Joosten et al., (2003), см. выше; Joosten et al., (2005), см. выше; и в других цитируемых там работах.

Бипаратопные нанотела и полипептиды по изобретению могут быть также введены в одну или несколько клеток, тканей или органов многоклеточного организма и могут быть также экспрессированы в этих клетках, тканях или органах, например, в профилактических и/или терапевтических целях (например, для применения в генной терапии), как подробно описано на стр. 135 и 136 заявки WO 08/020079 и в других работах, цитируемых в WO 08/020079.

Для экспрессии нанотел в клетках эти нанотела могут быть также экспрессированы в виде так называемых "интраантител", описанных, например, в WO 94/02610, WO 95/22618, US-A-7004940; WO 03/014960; в публикации Cattaneo, A. & Biocca, S. (1997) *Intracellular Antibodies: Development and Applications*. Landes and Springer-Verlag; и в публикации Kontermann, *Methods* 34, (2004), 163-170.

Бипаратопные нанотела и полипептиды по изобретению могут также, например, продуцироваться в молоке трансгенных млекопитающих, например в молоке кроликов, коров, коз или овец (описание общих методов введения трансгенов млекопитающим можно найти, например, в US-A-6741957, US-A-6304489 и US-A-6849992), в растениях или в частях растений, включая, но не ограничиваясь ими, листья, цветы, плоды, семена, корни или клубни (например, табака, кукурузы, сои или люцерны), или, например, в куколках шелкопряда *Bombix mori*.

Кроме того, бипаратопные нанотела и полипептиды по изобретению могут также экспрессироваться и/или продуцироваться в бесклеточных экспрессионных системах, и подходящие примеры таких систем известны специалистам в данной области. Некоторыми предпочтительными, но не ограничивающимися примерами экспрессии является экспрессия в зернах пшеницы, в лизатах кроличьих ретикулоцитов или в системе *E.coli* Zubay.

Как упоминалось выше, одно из преимуществ использования бипаратопных полипептидов и нанотел заключается в том, что полипептиды, полученные на их основе, могут продуцироваться посредством экспрессии в подходящей бактериальной системе, где подходящие бактериальные экспрессионные системы, векторы, клетки-хозяева, регуляторные элементы и т.п. будут очевидны для специалиста исходя из описания цитируемых выше работ. Однако следует отметить, что настоящее изобретение, в его самом широком смысле, не ограничивается экспрессией в бактериальных системах.

В настоящем изобретении предпочтительно используется экспрессионная система (*in vivo* или *in vitro*), такая как бактериальная экспрессионная система, которая позволяет продуцировать полипептиды по изобретению в форме, подходящей для их применения в фармацевтике, и такие экспрессионные системы также известны специалистам в данной области. Специалистам в данной области также известно, что полипептиды по изобретению, подходящие для их использования в фармацевтике, могут быть получены методами пептидного синтеза.

В случае промышленного получения полипептидов предпочтительными гетерологичными хозяевами, предназначенными для (промышленного) получения бипаратопных нанотел или терапевтических белков, содержащих нанотела, являются штаммы *E.coli*, *Pichia pastoris*, *S.cerevisiae*, которые могут быть подходящими для крупномасштабной экспрессии/крупномасштабного получения/крупномасштабной ферментации, в частности для крупномасштабной экспрессии/крупномасштабного получения/крупномасштабной ферментации в фармацевтических целях (т.е. в случае использования GMP). Подходящие примеры таких штаммов известны специалистам. Такие штаммы и системы получения/экспрессии могут также поставляться такими компаниями, как Biovitrum (Uppsala, Sweden).

Альтернативно, клеточные линии млекопитающего, в частности клетки яичника китайского хомячка (СНО), могут быть использованы для крупномасштабной экспрессии/крупномасштабного получения/крупномасштабной ферментации, в частности крупномасштабной экспрессии/крупномасштабного получения/крупномасштабной ферментации в фармацевтических целях. И в этом случае такие системы экспрессии/получения также поставляются некоторыми упомянутыми выше компаниями.

Выбор конкретной экспрессионной системы частично зависит от требований, предъявляемых к некоторым посттрансляционным модификациям, а более конкретно к гликозилированию. Для получения рекомбинантного белка, содержащего нанотело, при котором желателен или необходимо гликозилиро-

вание, может потребоваться использование соответствующих млекопитающих-хозяев для экспрессии, способных гликозилировать экспрессированный белок. В соответствии с этим специалисту в данной области известно, что профиль гликозилирования (т.е. вид, число и положение присоединяемых остатков) зависит от клетки или клеточной линии, используемых для экспрессии. При этом предпочтительно использовать клетку человека или клеточную линию человека (т.е. продуцирующую белок, который, в основном, имеет профиль гликозилирования, характерный для человека) или клеточную линию другого млекопитающего, которая может обеспечивать профиль гликозилирования, являющийся в основном и/или функционально аналогичным профилю гликозилирования, характерному для человека, или, по меньшей мере, имитирующий профиль гликозилирования, характерный для человека. Как правило, прокариотические хозяева, такие как *E. coli*, не обладают способностью гликозилировать белки, а при использовании низших эукариотов, таких как дрожжи, профиль гликозилирования будет отличаться от профиля гликозилирования, характерного для человека. Тем не менее, следует отметить, что в настоящем изобретении могут быть использованы все вышеупомянутые клетки-хозяева и экспрессионные системы при условии, что они будут продуцировать нужное бипаратопное нанотело или нужный бипаратопный полипептид.

Таким образом, в соответствии с одним из аспектов изобретения бипаратопное нанотело или бипаратопный полипептид по изобретению являются гликозилированными. В соответствии с другим неограничивающим аспектом изобретения аминокислотная последовательность, нанотело или полипептид по изобретению не являются гликозилированными.

В соответствии с одним предпочтительным, но неограничивающим аспектом изобретения бипаратопное нанотело или полипептид по изобретению продуцируются в бактериальной клетке, в частности в бактериальной клетке, подходящей для крупномасштабного производства фармацевтических средств, а именно, в клетках вышеупомянутых штаммов.

В соответствии с другим предпочтительным, но неограничивающим аспектом изобретения бипаратопное нанотело или полипептид по изобретению продуцируются в дрожжевой клетке, в частности в дрожжевой клетке, подходящей для крупномасштабного производства фармацевтических средств, а именно в клетках вышеупомянутых видов.

В соответствии с еще одним предпочтительным, но неограничивающим аспектом изобретения бипаратопное нанотело или полипептид по изобретению продуцируются в клетке млекопитающего, в частности в клетке человека или в клетке клеточной линии человека, а более конкретно в клетке человека или в клетке клеточной линии человека, подходящей для крупномасштабного производства фармацевтических средств, а именно в клеточных линиях, упомянутых выше.

Как описано на стр. 138 и 139 заявки WO 08/020079, если экспрессию в клетке-хозяине осуществляют для получения бипаратопных нанотел и полипептидов по изобретению, то эти антитела и полипептиды либо продуцируют внутри клеток (например, в цитозоле, в периплазме или в тельцах включения), а затем выделяют из клеток-хозяев и дополнительно, но необязательно, очищают, либо их продуцируют во внеклеточном пространстве (например, в среде для культивирования клеток-хозяев), а затем выделяют из культуральной среды и дополнительно, но необязательно, очищают. Таким образом, в соответствии с одним неограничивающим аспектом изобретения, бипаратопное нанотело или полипептид по изобретению представляют собой аминокислотную последовательность, нанотело или полипептид, которые были получены внутри клеток и выделены из клеток-хозяев, в частности из бактериальных клеток или из телец включения, присутствующих в бактериальных клетках. В соответствии с другим неограничивающим аспектом изобретения, бипаратопное нанотело или полипептид по изобретению представляют собой нанотело или полипептид, которые были получены во внеклеточном пространстве, и которые были выделены из среды для культивирования клеток-хозяев.

Некоторые предпочтительные, но неограничивающие примеры промоторов, которые могут быть использованы вместе с указанными клетками-хозяевами, упоминаются на стр. 139 и 140 заявки WO 08/020079.

Некоторые предпочтительные, но неограничивающие примеры секреторных последовательностей, которые могут быть использованы вместе с указанными клетками-хозяевами, упоминаются на стр. 140 заявки WO 08/020079.

Подходящие методы трансформации хозяина или клетки-хозяина по изобретению известны специалистам и могут быть выбраны в зависимости от рассматриваемой клетки-хозяина/организма-хозяина и от используемой генетической конструкции. Описание этих методов приводится в руководствах и в патентных заявках, упомянутых выше.

После трансформации может быть осуществлена стадия детектирования и отбора клеток-хозяев или организмов-хозяев, которые были успешно трансформированы нуклеотидной последовательностью/генетической конструкцией по изобретению. Такой стадией может быть, например, стадия отбора на основе селективного маркера, присутствующего в генетической конструкции по изобретению, или стадия, включающая детектирование полипептида по изобретению, например, с использованием специфических антител.

Трансформированные клетки-хозяева (которые могут присутствовать в форме стабильной клеточ-

ной линии) или организмы-хозяева (которые могут присутствовать в форме стабильной мутантной линии или мутантного штамма) входят в дополнительные аспекты изобретения.

Предпочтительно, чтобы эти клетки-хозяева или организмы-хозяева экспрессировали или (по меньшей мере) обладали способностью экспрессировать (например, в подходящих условиях) бипаратопное нанотело или полипептид по изобретению (а в случае организма-хозяина по меньшей мере в одной клетке, в одном участке, в одной ткани или в одном органе). Настоящее изобретение также включает дополнительные генерации, потомство клетки-хозяина или низшего организма-хозяина и/или потомство высшего организма-хозяина по изобретению, которое может быть, например, получено посредством деления клетки или путем полового или бесполого размножения.

Для получения/достижения экспрессии аминокислотных последовательностей по изобретению трансформированная клетка-хозяин или трансформированный организм-хозяин, по существу, могут поддерживаться и сохраняться и/или могут быть культивированы в условиях, способствующих экспрессии/получению (нужного) бипаратопного нанотела или полипептида по изобретению. Подходящие условия известны специалистам и обычно зависят от используемой клетки-хозяина/используемого организма-хозяина, а также от регуляторных элементов, под контролем которых происходит экспрессия (релевантной) нуклеотидной последовательности по изобретению. Описание таких условий приводится в вышеупомянутых руководствах и в патентных заявках, в параграфах, относящихся к генетическим конструкциям по изобретению.

В общих чертах, подходящие условия могут включать использование соответствующей среды, присутствие подходящего питательного источника и/или подходящих микроэлементов, создание подходящей температуры и присутствие, но необязательно, подходящего индуцирующего фактора или соединения (например, если нуклеотидные последовательности по изобретению находятся под контролем индуцибельного промотора), причем все указанные условия могут быть выбраны самим специалистом. В таких условиях полипептид по изобретению может также экспрессироваться конститутивно, транзитивно или только в присутствии соответствующего индуктора.

Для специалиста в данной области также очевидно, что бипаратопное нанотело или полипептид по изобретению могут быть (сначала) получены в незрелой форме (как упоминалось выше), а затем они могут быть подвергнуты посттрансляционной модификации в зависимости от используемой клетки-хозяина/используемого организма-хозяина. И в этом случае бипаратопное нанотело или бипаратопный полипептид по изобретению могут быть гликозилированными в зависимости от используемой клетки-хозяина/используемого организма-хозяина.

Бипаратопное нанотело или бипаратопный полипептид по изобретению могут быть затем выделены из клетки-хозяина/организма-хозяина и/или из среды для культивирования указанной клетки-хозяина или указанного организма-хозяина с применением методов выделения и/или очистки белков, известных *per se*, таких как (препаративная) хроматография и/или электрофорез, методы дифференциальной преципитации, аффинные методы (например, с использованием специфически отщепляемой аминокислотной последовательности, связанной с аминокислотной последовательностью, нанотелом или полипептидом по изобретению) и/или препаративные иммунологические методы (т.е. с использованием антител против выделяемой аминокислотной последовательности).

В общих чертах, полипептиды по изобретению, используемые в фармацевтике, могут быть получены в виде фармацевтического препарата или фармацевтических композиций, содержащих по меньшей мере один полипептид по изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, наполнитель и/или адъювант и, необязательно, один или несколько дополнительных фармацевтически активных полипептидов и/или соединений. В неограничивающих примерах такой препарат может быть получен в форме, подходящей для перорального введения, для парентерального введения (например, внутривенной, внутримышечной или подкожной инъекции или внутривенного вливания), для местного введения, для введения путем ингаляции (например, с помощью аэрозольного ингалятора, ингалятора с дозируемым клапаном (MDI) или инсуффлятора (DPI), или путем интраназального введения), в форме кожного пластыря, имплантата, суппозитория, подъязычных препаратов и т.п. Такие подходящие формы для введения, которые могут быть твердыми, полутвердыми или жидкими в зависимости от способа введения, а также методы и носители, применяемые для получения таких препаратов, известны специалистам и более подробно описаны ниже.

Таким образом, в другом своем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере один бипаратопный полипептид по изобретению, предпочтительно по меньшей мере один вариабельный домен одного бипаратопного иммуноглобулина, а более предпочтительно по меньшей мере одно бипаратопное нанотело по изобретению, и по меньшей мере один подходящий носитель, разбавитель или наполнитель (т.е. подходящий для использования в фармацевтике) и, необязательно, одно или несколько других активных веществ.

Как правило, бипаратопные полипептиды по изобретению могут быть получены и введены любым подходящим способом, известным *per se*, например, описанным в цитируемых выше заявках (в частности, в WO 04/041862, WO 04/041863, WO 04/041865, WO 04/041867 и WO 08/020079), а также в стандартных руководствах, таких как руководство Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publish-

ing Company, USA (1990), Remington, the Science and Practice of Pharmacy, 21th Edition, Lippincott Williams and Wilkins (2005); или в руководстве Handbook of Therapeutic Antibodies (S. Dubel, Ed.), Wiley, Weinheim, 2007 (см., например, стр. 252-255).

Так, например, бипаратопные полипептиды по изобретению могут быть получены и введены любым способом, известным *per se* и применяемым для получения стандартных антител и фрагментов антител (включая scFv и диатела), а также других фармацевтически активных белков. Такие препараты и методы их получения известны специалистам, и такими препаратами являются препараты, подходящие для парентерального введения (например, для внутривенного, внутривнутрибрюшинного, подкожного, внутримышечного, внутримышечного, внутриартериального или интратекального введения) или для местного (т.е. чрезкожного или интрадермального) введения.

Препаратами для парентерального введения могут быть, например, стерильные растворы, суспензии, дисперсии или эмульсии, подходящие для вливания или инъекции. Подходящими носителями или разбавителями для таких препаратов являются, например, но не ограничиваются ими, носители или разбавители, упоминаемые на стр. 143 заявки WO 08/020079. При этом предпочтительными являются водные растворы или суспензии.

Бипаратопные полипептиды по изобретению, включая отдельные переменные домены бипаратопного иммуноглобулина и бипаратопного нанотела, могут быть также введены методами генотерапии, см., например, патент США № 5399346, который во всей своей полноте вводится в настоящее описание в качестве ссылки. С применением метода доставки посредством генотерапии первичные клетки, трансфицированные геном, кодирующим бипаратопный полипептид по изобретению, могут быть дополнительно трансфицированы тканеспецифическими промоторами для доставки гена в конкретные органы, ткани, трансплантаты, опухоли или клетки, и эти клетки могут быть дополнительно трансфицированы сигнальными и стабилизирующими последовательностями, стимулирующими экспрессию в субклеточном пространстве.

Таким образом, бипаратопные полипептиды, отдельные переменные домены иммуноглобулина и нанотела по изобретению могут быть введены системно, например, перорально, в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, таким как инертный разбавитель или хорошо усвояемый пищевой носитель. Они могут быть включены в твердые или мягкие желатиновые капсулы, спрессованы в таблетки или введены пациенту непосредственно с пищей. Для перорального терапевтического введения бипаратопные полипептиды по изобретению могут быть объединены с одним или несколькими наполнителями и использованы в форме таблеток для проглатывания, подщечных таблеток для рассасывания, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток и т.п. Такие композиции и препараты должны содержать по меньшей мере 0,1% бипаратопного полипептида, одного переменного домена иммуноглобулина или нанотела по изобретению. Их процентное содержание в композициях и препаратах может варьироваться, но обычно оно составляет приблизительно от 2 до 60% по массе указанной единичной дозы. Количество бипаратопного полипептида по изобретению, присутствующего в таких терапевтически приемлемых композициях, должно быть таким, чтобы достигалась его эффективная доза в кровотоке.

Таблетки, пастилки, драже, капсулы и т.п. могут также содержать связующие вещества, наполнители, дезинтегрирующие средства, замасливатели, подсластители или ароматизаторы, например, упоминаемые на стр. 143-144 заявки WO 08/020079. Если формой единичной дозы является капсула, то она может содержать, помимо веществ вышеупомянутого типа, жидкий носитель, такой как растительное масло или полиэтиленгликоль. Различные другие вещества могут присутствовать в виде покрытий или для какой-либо другой физической модификации твердой формы единичной дозы. Например, таблетки, драже или капсулы могут быть покрыты желатином, воском, шеллаком или сахаром и т.п. Сироп или эликсир может содержать бипаратопные нанотела и полипептиды по изобретению, сахарозу или фруктозу в качестве подсластителя, метилпарабены и пропилпарабены в качестве консервантов, а также краситель и отдушку, такую как вишневый или апельсиновый ароматизатор. Очевидно, что любое вещество, используемое для получения любой формы единичной дозы, должно быть фармацевтически приемлемым и, по существу, нетоксичным при его использовании в определенных количествах. Кроме того, бипаратопные нанотела, отдельные переменные домены иммуноглобулина и полипептиды по изобретению могут быть введены в препараты и устройства пролонгированного высвобождения.

Препараты и композиции для перорального введения могут также иметь энтеросолюбильное покрытие, позволяющее конструкциям по изобретению сохраняться в желудочной среде и проходить в тонкий кишечник. Как правило, препараты и композиции для перорального введения могут быть соответствующим образом приготовлены для доставки в любую нужную часть желудочно-кишечного тракта. Кроме того, для доставки нужных соединений в желудочно-кишечный тракт могут быть использованы подходящие суппозитории.

Бипаратопные нанотела, отдельные переменные домены иммуноглобулина и полипептиды по изобретению могут быть также введены внутривенно или внутривнутрибрюшинно путем вливания или инъекции, как подробно описано на стр. 144 и 145 заявки WO 08/020079.

Для местного введения бипаратопные нанотела, отдельные переменные домены иммуноглобулина и полипептиды по изобретению могут быть получены в чистой форме, т.е. если они являются жидко-

стями. Однако, как правило, желательно, чтобы они были нанесены на кожу в виде композиций или препаратов или в комбинации с дерматологически приемлемым носителем, который может быть твердым или жидким, как подробно описано на стр. 145 заявки WO 08/020079.

В общих чертах, концентрация бипаратопных нанотел, отдельных вариабельных доменов иммуноглобулина и полипептидов по изобретению в жидкой композиции, такой как лосьон, составляет приблизительно 0,1-25 мас.%, а предпочтительно приблизительно 0,5-10 мас.%. Их концентрация в полутвердой или в твердой композиции, такой как гель или порошок, составляет приблизительно 0,1-5 мас.%, а предпочтительно, приблизительно 0,5-2,5 мас.%.

Количество бипаратопных нанотел, отдельных вариабельных доменов иммуноглобулина и полипептидов по изобретению, необходимое для их использования в терапии, варьируется в зависимости не только от конкретно выбранного бипаратопного нанотела или полипептида, но также и от способа введения, природы состояния, подвергаемого лечению, от возраста и состояния здоровья пациента и, в конечном счете, от назначения лечащего врача или врача-клинициста. Кроме того, доза этих бипаратопных нанотел и полипептидов по изобретению варьируется в зависимости от типов клеток-мишеней, опухолей, тканей, трансплантатов или органов.

Желаемой дозой обычно является единичная доза или дробные дозы, вводимые через соответствующие интервалы, например два, три, четыре или более раз в день. Такая субъединичная доза может быть также разделена, например, на ряд дискретных доз, вводимых через определенные интервалы, таких как многократные ингаляции с помощью инсуффлятора или закапывания в глаза в виде нескольких капель.

Схема введения доз может включать продолжительное ежедневное введение. Термин "продолжительное введение" означает введение в течение по меньшей мере двух недель, а предпочтительно несколько недель, месяцев или лет. Необходимые изменения в этой схеме введения могут быть внесены самим специалистом в данной области с помощью лишь рутинного экспериментирования в соответствии с приведенным в настоящем документе описанием. См. руководство Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. В случае каких-либо осложнений доза может быть также скорректирована лечащим врачом.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболеваний или состояний, связанных с нарушением передачи CXCR2-сигнала, путем введения эффективного количества полипептида или фармацевтической композиции по изобретению, а предпочтительно отдельных вариабельных доменов бипаратопного иммуноглобулина или бипаратопных нанотел, или композиции, содержащей такие домены или нанотела по изобретению. Как обсуждается в настоящей заявке, передача CXCR2-сигнала опосредует воспалительный ответ в легких пациентов, страдающих хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), что приводит к деструкции паренхимы легких. Миграция лейкоцитов, число которых в легких пациентов, страдающих ХОБЛ, повышается, опосредуется рецептором CXCR2 на поверхности таких клеток, и этот рецептор CXCR2 связывается с несколькими лигандами, включая IL-8, GRO- α , β , γ , EMA 78 и GCP-2. Повышенное число нейтрофилов в легких коррелирует с тяжестью заболевания. Кроме того, концентрация GRO- α заметно увеличивается в индуцированной мокроте и в бронхиальном лаваже (BAL) пациентов с ХОБЛ. В соответствии с этим предполагается, что подавление CXCR2 будет предотвращать, устранять или снижать дистресс-симптомы этого заболевания.

В соответствии с этим настоящее изобретение относится к способам профилактики или лечения ХОБЛ или обострений ХОБЛ, где указанные способы включают введение бипаратопного полипептида, такого как отдельные вариабельные домены бипаратопного иммуноглобулина или бипаратопных нанотел по изобретению, в частности фармацевтических композиций, содержащих такие домены или нанотела. Настоящее изобретение также относится к применению указанного бипаратопного полипептида, включая бипаратопные нанотела и содержащие их композиции, для лечения ХОБЛ и обострений ХОБЛ.

Как будет очевидно для специалиста, бипаратопные полипептиды по изобретению, в частности отдельные вариабельные домены бипаратопного иммуноглобулина или бипаратопных нанотел по изобретению и содержащие их композиции, могут быть также использованы для лечения других заболеваний, которые связаны с нарушением функции передачи CXCR2-сигнала, например других заболеваний дыхательных путей, таких как кистозный фиброз, астма в тяжелой форме, обострение астмы, аллергическая астма, острое поражение легких, острый респираторный дистресс-синдром, идиопатический фиброз легких, ремоделирование дыхательных путей, синдром облитерирующего бронхиолита или бронхопульмонарная дисплазия.

Другими заболеваниями и состояниями, для которых возможна профилактика или лечение с использованием бипаратопных полипептидов по изобретению, например, отдельных вариабельных доменов бипаратопного иммуноглобулина или бипаратопных нанотел и содержащих их фармацевтических композиций, являются атеросклероз, гломерулонефрит, воспалительное заболевание кишечника (болезнь Крона), ангиогенез и заболевания, характеризующиеся образованием новых кровеносных сосудов, включая дегенерацию желтого пятна, диабетическую ретинопатию и диабетическую невропатию, рассеянный склероз, псориаз, возрастную дегенерацию желтого пятна, глазную болезнь Бехчета, увеит, легочную

артериальную гипертензию (ЛАГ), включая идиопатическую ЛАГ, наследственную ЛАГ и заболевание, связанное с ЛАГ; хронические воспалительные заболевания, ревматоидный артрит, остеоартрит, немелкоклеточную карциному, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак пищевода, рак яичника, рак молочной железы, солидные опухоли и их метастазы, меланому, гепатоцеллюлярную карциному или ишемическое реперфузионное повреждение.

Другими заболеваниями и состояниями, для которых возможна профилактика или лечение с использованием бипаратопных полипептидов по изобретению, например, отдельных переменных доменов бипаратопного иммуноглобулина или бипаратопных нанотел и содержащих их фармацевтических композиций, являются закупорка сосудов, вызванная гемолитической трансфузией при серповидноклеточной анемии, ишемическое/реперфузионное повреждение, острый инсульт/инфаркт миокарда, закрытая травма головы, посттравматическое воспаление и инсулинорезистентный диабет.

Для осуществления вышеописанных способов бипаратопные нанотела, отдельные переменные домены иммуноглобулина и/или полипептиды по изобретению и/или содержащие их композиции могут быть введены любым подходящим способом в зависимости от конкретно используемого фармацевтического препарата или от конкретно используемой фармацевтической композиции. Таким образом, бипаратопные нанотела и/или полипептиды по изобретению и/или содержащие их композиции могут быть введены, например, перорально, внутривенно (например, внутривенно, подкожно, внутримышечно или любым другим способом введения в обход желудочно-кишечного тракта), интраназально, трансдермально, местно, с помощью суппозитория и путем ингаляции в зависимости от конкретно используемых фармацевтических препаратов или композиций. Как правило, для лечения ХОБЛ, ингаляция не является предпочтительной. Врач-клиницист может самостоятельно выбрать подходящий способ введения и подходящие фармацевтические препараты или композиции, используемые для такого введения, в зависимости от индивидуальных особенностей пациента.

Бипаратопные нанотела, отдельные переменные домены иммуноглобулина и/или полипептиды по изобретению и/или содержащие их композиции вводят в соответствии со схемой лечения, которая является наиболее подходящей для профилактики и/или лечения данного заболевания или расстройства. Как правило, врач-клиницист может самостоятельно выбрать подходящую схему лечения в зависимости от таких факторов, как конкретное заболевание или расстройство, которое должно быть подвергнуто лечению, или его профилактика; тяжесть заболевания, подвергаемого лечению, и/или тяжесть его симптомов; конкретно используемые бипаратопные нанотела; отдельные переменные домены иммуноглобулина или полипептиды по изобретению; конкретная схема введения, конкретно используемые фармацевтический препарат или фармацевтическая композиция; возраст, пол, масса, режим питания, общее состояние здоровья пациента, а также от других аналогичных факторов, хорошо известных врачам-клиницистам.

Как правило, для профилактики и/или лечения вышеупомянутых заболеваний и расстройств, в частности ХОБЛ, вводимая доза будет зависеть от активности конкретно используемых бипаратопных нанотел, отдельных переменных доменов иммуноглобулина или полипептидов по изобретению, конкретного способа введения или конкретно используемых фармацевтических препаратов или композиций. Как правило, вводимая доза составляет от 1 г до 0,01 мкг на 1 кг массы тела в день, предпочтительно от 0,1 г до 0,1 мкг на 1 кг массы тела в день, а именно приблизительно 1, 10, 100 или 1000 мкг на 1 кг массы тела в день и может быть введена либо непрерывно (например, путем вливания), либо в виде одной суточной дозы или нескольких дробных доз в течение суток. Как правило, врач-клиницист может самостоятельно определить подходящую суточную дозу в зависимости от упомянутых в настоящем документе факторов. Также очевидно, что в конкретных случаях врач-клиницист может выбрать или изменить эти дозы, например, с учетом указанных выше факторов и исходя из результатов экспертной оценки.

Бипаратопные нанотела, отдельные переменные домены иммуноглобулина и полипептиды по изобретению могут быть также использованы в комбинации с одним или несколькими фармацевтически активными соединениями или действующими веществами лекарственного средства, т.е. они могут быть введены в соответствии с конкретной комбинированной схемой лечения, которая может давать, а может и не давать синергический эффект. И в этом случае врач-клиницист может самостоятельно выбрать указанные дополнительные соединения или действующие вещества лекарственного средства, а также подходящую комбинированную схему лечения с учетом вышеупомянутых факторов и исходя из результатов экспертной оценки.

Например, бипаратопные полипептиды, такие как бипаратопные нанотела по изобретению, могут быть объединены со стандартными препаратами для лечения ХОБЛ, такими как β -адренергические бронхорасширяющие средства кратковременного и пролонгированного действия, антихолинергические средства (антагонисты мускариновых рецепторов), вводимые путем ингаляции; и кортикостероиды, вводимые путем ингаляции.

Эффективность схемы лечения данного заболевания или расстройства, применяемой в соответствии с настоящим изобретением, может быть определена и/или проанализирована любым способом, известным врачу-клиницисту *per se*. В каждом отдельном случае врач-клиницист, если это необходимо, может также самостоятельно изменить или модифицировать конкретную схему лечения в целях достижения

желаемого терапевтического эффекта, а также в целях профилактики, ограничения или снижения нежелательных побочных эффектов и/или в целях достижения соответствующего баланса между желаемым терапевтическим эффектом, с одной стороны, и предотвращением, ограничением или снижением нежелательных побочных эффектов, с другой стороны.

В общих чертах, курс лечения проводят до тех пор, пока не будет достигнут желаемый терапевтический эффект, и/или до тех пор, пока желаемый терапевтический эффект не будет стабильным. И в этом случае такой эффект также может быть определен врачом-клиницистом.

Индивидуумом, подвергаемым лечению, может быть любое теплокровное животное, в частности млекопитающее, а более конкретно человек. Как очевидно для специалиста, индивидуумом, подвергаемым лечению, в частности, является пациент, страдающий вышеупомянутыми заболеваниями и расстройствами, или пациент с риском развития таких заболеваний и расстройств.

Настоящее изобретение более подробно описано со ссылками на нижеследующие неограничивающие предпочтительные аспекты, примеры и фигуры.

Все цитируемые в настоящем документе публикации вводятся в настоящее описание в качестве ссылки.

Информация о депонировании.

Шесть депозитов плазмидной ДНК со вставками, кодирующими полипептиды нанотел с оптимизированной последовательностью, представлены в табл. 32 и были депонированы 15 июня 2010 г. в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ, Deutsche SammlUng von Mikroorganismen and Zallkulturem GmbH, Inhoffenstrasse, 7B, D-38124, Braunschweig, Germany by Novartis Pharma AG, Switzerland). Депозиты были сделаны 28 апреля 1997 г. в соответствии с Будапештским договором о Международном признании депонирования микроорганизмов для проведения патентной процедуры и имеют следующие регистрационные номера:

Конструкция дикого типа	Оптимизированная конструкция	Номер депозита (DSM)
2B2	C100CXCR20059	DSM 23723
97A9	C100CXCR20061	DSM 23724
163E3	C100CXCR20076	DSM 23725
127D1	C100CXCR20079	DSM 23726
163D2	C100CXCR20086	DSM 23727
54B12	C100CXCR20104	DSM 23728

1. Клонирование CXCR2 человека и собакоподобных обезьян.

Таблица 1

CXCR2 человека SEQ ID NO. 1	MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSSTLPPFLDDAAPCEPESLEINKYFVVIYALV FLLSLLGNSLVMLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPIWAASKVNGWIFGTFL CKVVSLLKEVNFYSGILLACISVDRYLAIVHATRRTLQKRYLVKFICLSIWGLSLLLALP VLLFRRTVYSSNVSPACYEDMGNNNTANWRMLLRILPQSFQFIVPILLIMLFCYGFTRLR LFAHMGQKHRAMRVIFAVVLIFFLLCWLPYNLVLLADTLMRQTQVIQETCERRNHIDRA LDATEILGILHSCLNPLIYAFIQKFRHGLLKILAIHGLISKDSLKDSRPSFVGSSTHTSTTL
Δ1-17 CXCR2 человека SEQ ID NO. 2	MEDLSNYSYSSTLPPFLDDAAPCEPESLEINKYFVVIYALVFLSLLGNSLVMLVILYS RVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPIWAASKVNGWIFGTFLCKVVSLLKEVNFYSGIL LLACISVDRYLAIVHATRRTLQKRYLVKFICLSIWGLSLLLALPVLFRRTVYSSNVSPA CYEDMGNNNTANWRMLLRILPQSFQFIVPILLIMLFCYGFTRLRFLFAHMGQKHRAMRV IFAVVLIFFLLCWLPYNLVLLADTLMRQTQVIQETCERRNHIDRALDATEILGILHSCLNPLI YAFIQKFRHGLLKILAIHGLISKDSLKDSRPSFVGSSTHTSTTL
CXCR2 собакоподобных обезьян SEQ ID NO. 3	MQSFNFEDFWENEDFSNYSYSDDLPPSLPDVAPCRPESLEINKYFVVIYALVFLSLL GNSLVMLVILHSRVGRSITDVYLLNLAMADLLFALTLPIWAAAKVNGWIFGTFLCKVVS LLKEVNFYSGILLACISVDRYLAIVHATRRTLQKRYLVKFVCLSIWVSLLLLALPVLFR RTVYLYISPVCYEDMGNNNTAKWRMVLRLPQTFGFILPILLIMLFCYGFTRLRFLFAHMG QKHRAMRVIFAVVLIFFLLCWLPYHVLVLLADTLMRTRLINETCQRRNNDQALDATEIL GILHSCLNPLIYAFIQKFRHGLLKILATHGLISKDSLKDSRPSFVGSSTHTSTTL

pcDNA3.1(+) (Invitrogen, V790-20) конструировали для обеспечения высокого уровня конститутивной экспрессии в различных клеточных линиях млекопитающих. Этот плазмидный вектор содержит преданный промотор цитомегаловируса человека, сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH), маркер отбора на резистентность к неомицину для клеток млекопитающих и ген отбора на резистентность к ампициллину в *E. coli*.

pVAX1(Invitrogen, V260-20) представляет собой плазмидный вектор, сконструированный для ДНК-вакцин. Этот плазмидный вектор содержит преданный промотор цитомегаловируса человека, сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH) и ген отбора на резистентность к канамицину в *E. coli*.

Конструкции

Рецептор	Вектор	Конструкция
CXCR2 человека (N-концевая 3 х HA-метка)	pcDNA4/TO	Субклонировали последовательность ДНК, кодирующую три HA-метки, затем последовательность CXCR2 человека, а затем (в скобках) сайты рестриктирующих ферментов HindIII и XhoI в 5'- и 3'-концы, соответственно, в pcDNA4/TO
N-концевая CCR9-химера CXCR2 человека (N-концевая 3 х HA-метка)	pcDNA4/TO	Субклонировали последовательность ДНК, кодирующую три HA-метки, затем первые 39 аминокислот для CCR9 человека, сайт протеазы TEV и последовательность CXCR2 человека без N-концевых 43 аминокислот, а затем (в скобках) сайты рестриктирующих ферментов HindIII и XhoI в 5'- и 3'-концы, соответственно, в pcDNA4/TO
Δ1-17 CXCR2 человека (N-концевая 3 х HA-метка)	pcDNA4/TO	Субклонировали последовательность ДНК, кодирующую три HA-метки, затем последовательность CXCR2 человека без N-концевых 17 аминокислот, а затем (в скобках) сайты рестриктирующих ферментов HindIII и XhoI в 5'- и 3'-концы, соответственно, в pcDNA4/TO
CXCR2 человека	pXoon	кДНК CXCR2 человека (чел. CXCR2) (GENBANK:L.19593) амплифицировали с помощью ПЦР с использованием 5'-праймера, содержащего EcoRI-сайт расщепления, и 3'-праймера, содержащего NotI-сайт. ПЦР-продукт лигировали в плазмидный вектор pXOON
CXCR2 собакоподобных обезьян	pcDNA3.1	кДНК CXCR2 собакоподобных обезьян амплифицировали из библиотеки кДНК селезенки/тимуса собакоподобных обезьян. Сайты рестриктирующих ферментов NotI и XhoI добавляли с помощью ПЦР и полученный фрагмент клонировали в pcDNA3.1
CXCR2 человека	pVAX1	ПЦР (NheI-NotI) для pXoon_hCXCR2
CXCR2 собакоподобных обезьян	pVAX1	NheI-XhoI от pcDNA3.1_cCXCR2
Δ1-17 CXCR2 человека	pVAX1	ПЦР (HindIII-XhoI) для pcDNA3.1_3xHA-Δ1-17-hCXCR2
Δ1-17 CXCR2 человека (N-концевая 3 х HA-метка)	pcDNA3.1	HindIII-XhoI от pCR4Blunt-TOPO_3xHA-Δ1-17-hCXCR2
CXCR2 человека	pcDNA3.1	NheI-XhoI от pVAX1_hCXCR2

2. Получение клеточных линий CHO, CaKi, RBL и HEK293T, экспрессирующих CXCR2 человека и собакоподобных обезьян.

Клеточные линии

Хозяин	Трансформация	Рецептор	Вектор
CHO	Стабильная	$\Delta 1-17$ CXCR2 человека (N-концевая 3xHA-метка)	pcDNA3.1
HEK293T	Кратковременная	CXCR2 собакоподобных обезьян	pcDNA3.1
CaKi info для добавления			
/	ДНК-иммунизация	CXCR2 человека	pVAX1
/	ДНК-иммунизация	CXCR2 собакоподобных обезьян	pVAX1
/	ДНК-иммунизация	$\Delta 1-17$ CXCR2 человека	pVAX1
RBL	Стабильная	кДНК CXCR2 человека	pSFFV-Neo
RBL-2H3	Стабильная	кДНК CXCR2 собакоподобных обезьян	pcDNA3.1
CHO-Trex	Стабильная	(HA) 3-huCXCR2	pcDNA4/TO
CHO-Trex	Стабильная	(HA) 3-huCCR9-huCXCR2	pcDNA4/TO
CHO-Trex	Стабильная	(HA) 3-huCXCR2 $\Delta N1-17$	pcDNA4/TO
L2071	Стабильная	CXCR1 человека	pSFFV-Neo
SEM	Эндогенная	CXCR4	-

CXCR2 человека $\Delta 1-17$ CHO-K1 (N-концевая 3xHA-метка).

Клетки CHO-K1 трансфицировали плазмидой pcDNA3.1_{3xHA}- $\Delta 1-17$ -hCXCR2 с использованием системы электропорации Амаха (программа U 23 в растворе T). Пул трансфицированных клеток выдерживали под давлением отбора (1000 мкг/мл G418) через два дня после трансфекции. Через восемь дней популяцию, содержащую CXCR2 человека, идентифицировали с использованием FМAT Blue-меченного GRO- α человека. FМAT Blue-мечение GRO- α человека (Biosource, PNC1063) осуществляли с использованием набора с монофункциональным реактивным красителем FМAT Blue в соответствии с инструкциями производителей (Applied Biosystems, 4328408). Отдельные клетки отбирали в 96-луночных планшетах для культивирования клеток с использованием FACSaria (BD Biosciences). Растущие клоны тестировали на экспрессию $\Delta 1-17$ CXCR2 человека на устройстве FACSarray (BD Biosciences) с использованием FМAT Blue-меченного GRO- α человека. Были отобраны клоны CHO-K1 с наилучшей экспрессией (величина MCF = 9000).

CXCR2 HEK293T собакоподобных обезьян.

Клетки HEK293T трансфицировали плазмидой pcDNA3.1_cCXCR2 с использованием трансфицирующего реагента FuGene HD Transfection Reagent (Roche). Через два дня после трансфекции клетки тестировали на экспрессию CXCR2 собакоподобных обезьян (сCXCR2) на устройстве FACSarray (BD Biosciences) с использованием 50 нМ FМAT Blue-меченного GRO- α . Также были использованы клетки с хорошей экспрессией (величина MCF равна приблизительно 12000).

CXCR2 RBL-2H3 собакоподобных обезьян.

Клетки крыс с базофильным лейкозом (RBL-2H3), культивированные при 37°C/5% CO₂ и рутинно субкультивированные в MEM-среде Игла (Invitrogen), в которую были добавлены 1x заменимые аминокислоты, 0,15% бикарбоната натрия, 1 мМ пирувата натрия и 15% фетальной бычьей сыворотки (Invitrogen), подвергали нуклеофекции путем электропорации (Амаха Biosystems) в соответствии с инструкциями производителей. Трансфицированные клетки инкубировали при 37°C/5% CO₂ и через 24 ч после трансфекции проводили отбор на антибиотики путем добавления генетина до конечной концентрации 1 мг/мл. Трансфицированные клетки культивировали и субкультивировали в течение 3-5 дней в среде для отбора, а затем подвергали моноклеточному сортированию путем серийного разведения в 96-луночных планшетах. Приблизительно через две недели колонии, обнаруживающие активный рост, размножали, а затем анализировали на экспрессию транскрипта CXCR2 собакоподобных обезьян. Позитивные клоны также дополнительно размножали для проведения анализа.

Гибрид CHO-Trex (HA)3-huCXCR2 и (HA)3huCCR9-CXCR2.

Клетки яичника китайского хомячка T-Rex (T-RexTM-CHO, Invitrogen, #R718-07) выдерживали при 37°C в виде монослойных культур в среде Хэмса F12, содержащей 2 мМ L-глутамин, в которую было добавлено 10% фетальной бычьей сыворотки, не содержащей тетрациклина (FBS) (Biosera), 1% пенициллина/стрептомицина и 10 мкг/мг бластицидина. Клеточная линия с регулируемой тетрациклином

экспрессией (T-Rex™) стабильно экспрессировала тетрациклиновый репрессор (TetR). Затем получали стабильные клеточные линии, экспрессирующие CXCR2-конструкции, в соответствии с процедурой нуклеофекции (набор для нуклеофекции клеточных линий T, Amaha Biosystem, программа U-23). Трансфицированные клетки инкубировали при 37°C/5% CO₂ и обрабатывали 300 мкг/мл зеоцина через 48 ч после трансфекции. Клетки культивировали в течение двух недель в присутствии зеоцина для отбора на позитивные трансформанты, а затем проводили моноклеточный сортинг на FACS-сортере Mo-Flo. Через две недели колонии, обнаруживающие активный рост, размножали и выдерживали в стандартной среде для их культивирования при концентрации зеоцина 300 мкг/мл.

3. GRO-α человека, GRO-α собакоподобных обезьян, IL-8 человека, ENA-78 человека.

Таблица 4

NVTS-IL-8, ENA-78, GRO-α собакоподобных обезьян

Лиганд	Комментарии	Источник
Gro-α человека	Рекомбинантный	Biosource (PHC1063)
IL-8 человека	Рекомбинантный	Novartis Vienna
ENA-78 человека	Рекомбинантный	Peprotech ltd (300-22)
Gro-α собакоподобных обезьян	Рекомбинантный	ALMAC Sciences

4. Пептиды.

Пептиды, представляющие собой различные N-концевые фрагменты и фрагменты внеклеточной петли (EL) CXCR2 человека и собакоподобных обезьян, были закуплены у Bachem (табл. 5). В пептидах, называемых "циклическими", первая и последняя аминокислоты были заменены цистеиновым остатком, а природные внутренние цистеины в последовательности дикого типа были заменены лейциновым остатком. Эти пептиды были подвергнуты реакции циклизации под действием фланкирующих цистеиновых остатков.

Таблица 5

Название	Последовательность	Модификация
1-14 собакоподобных обезьян	MQSFNFEDFWENED SEQ ID NO:4	C-конец, конъюгированный с биотином
Циклический EL3 собакоподобных обезьян	CTLMRTRLINETLQRRNC SEQ ID NO:5	N-конец, конъюгированный с биотином или с KLN
Циклический EL2 собакоподобных обезьян	CRRTVYLTYISPVLIEDMGNNTALWC SEQ ID NO:6	N-конец, конъюгированный с биотином или с KLN
1-19 человека	MEDFNMESDSFEDFWKGED SEQ ID NO:7	C-конец, конъюгированный с биотином
18-48 человека	EDLSNYSYSSTLPPFLLDAAAPCEPESLEI SEQ ID NO:8	C-конец, конъюгированный с биотином
EL2 человека	FRRTVYSSNVSPACYEDMGNNTANWR SEQ ID NO:9	N-конец, конъюгированный с биотином или с KLN
Циклический EL2 человека	CRRTVYSSNVSPALYEDMGNNTANWC SEQ ID NO:10	N-конец, конъюгированный с биотином или с KLN
EL3 человека	DTLMRTQVIQETCERRNH SEQ ID NO:11	N-конец, конъюгированный с биотином или с KLN
Циклический EL3 человека	CTLMRTQVIQETLERRNC SEQ ID NO:12	N-конец, конъюгированный с биотином или с KLN

5. Иммунизация.

Три ламы были иммунизированы 7-9 раз клетками млекопитающих, экспрессирующими CXCR2 человека, а одна лама была иммунизирована 6 раз клетками млекопитающих, экспрессирующими CXCR2 собакоподобных обезьян. Такая схема иммунизации включала четыре введения коктейля из конъюгата "пептид-гемоцианин лимфы улитки (KLH)", смешанного с (не)полным адьювантом Фрейнда; пептидов, представляющих собой внеклеточные петли CXCR2 человека и собакоподобных обезьян №№ 2 и 3 (см. табл. 5). Восемь других лам были иммунизированы 4-5 раз ДНК, кодирующей человеческий полноразмерный CXCR2 или $\Delta 1-17$ CXCR2, экспрессированный из pVAX1 с последующим одним введением клеток млекопитающих, экспрессирующих человеческий полноразмерный CXCR2. Три других ламы были иммунизированы 4 раза ДНК, кодирующей CXCR2 собакоподобных обезьян, экспрессированный из pVAX1, с последующим одним введением клеток млекопитающих, экспрессирующих CXCR2 собакоподобных обезьян. Через четыре и восемь дней после введения каждого антигена брали пробы иммунной крови и образцы лимфоузлов.

6. Конструирование библиотеки.

Образцы кДНК получали из всех РНК-препаратов иммунной крови и образцов лимфоузлов. Нуклеотидные последовательности, кодирующие нанотела, были амплифицированы из образцов кДНК, взятых у всех лам, иммунизированных CXCR2 человека или собакоподобных обезьян, путем проведения одностадийной ОТ-ПЦР-реакции с использованием праймеров ABL051, ABL052 и ABL003. Последовательности праймеров представлены в табл. 6. 700 п.н.-ампликоны, амплифицированные из кДНК IgG2 и IgG3 в образце, выделяли из геля, а затем использовали в качестве матрицы в "гнездовой" ПЦР-реакции, проводимой с использованием праймера ABL050, содержащего сайт рестриктирующего фермента SfiI, и праймера ABL003. Затем ПЦР-продукты гидролизовали ферментами SfiI и BstEII (обычно присутствующими в FR4 генов V_H) и лигировали в соответствующие рестрикционные сайты фагмидного вектора pAX50 с получением библиотеки после электропорации в TG-1 Escherichia coli. pAX50 представляет собой вектор экспрессии, полученный из pUC119, содержащей промотор LacZ, последовательность, кодирующую белок фаговых ворсинок E. coli, ген резистентности к ампициллину или карбенициллину, сайт множественного клонирования и лидерную последовательность gen3. Последовательность, кодирующая нанотело®, и вектор, кодирующий С-концевую с-тус-метку и (His)6-метку, находятся в одной рамке считывания. Фагмидный вектор позволяет продуцировать фаговые частицы, экспрессирующие отдельные нанотела в виде слитого белка с продуктом генIII.

Таблица 6

Последовательности праймеров

ABL051	GGCTGAGCTGGGTGGTCCTGG	SEQ ID NO. 13
ABL052	GGCTGAGTTTGGTGGTCCCTGG	SEQ ID NO. 14
ABL003	GGTACGTGCTGTTGAACGTTC	SEQ ID NO. 15
ABL050	CATTTGAGTTGGCCTAGCCGGCCATGGCAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGG	SEQ ID NO. 16
M13Fwd	TGTA AACGACGCGCCAGT	SEQ ID NO. 17
M13Rev	CAGGAAACAGCTATGACC	SEQ ID NO. 18
Rev_30GlySer	TCAGTAACCTGGATCCCCGCCACCGCTGCCTCCACCGCCGCTACCCCGCCACCGCTGCCTCCACCGCCTGAGGAGACGGTGACCTG	SEQ ID NO. 19
For_GlySer35	AGGTTACTGAGGATCCGGCGGTGGAGGCAGCGGAGGTGGGGGCTCTGGTGGCGG GGGTAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG	SEQ ID NO. 20
Fwd-EVQL-MfeI	GAGGTGCAATTGGTGAGTCTGGG	SEQ ID NO. 21
Rev-TVSS-BstEII	TGAGGAGACGGTGACCTGGGTCCC	SEQ ID NO. 22
Fwd-EVQL-BamHI	TCTTGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGG	SEQ ID NO. 23
Rev-TVSS-BspEI	ACCGCCTCCGGAGGAGACCGTGACCTGGGTCCC	SEQ ID NO. 24

7. Отбор.

Вышеупомянутые pAX50-библиотеки нанотел, экспрессированные на поверхности бактериофагов, отбирали с использованием пептидов, мембранных экстрактов и целых клеток, презентующих эпитопы CXCR2.

Отбор с использованием пептидов заключался в инкубировании фаговых библиотек на 0-1000 нМ биотинилированных пептидов (см. табл. 5), иммобилизованных на покрытых нейтравидином (Pierce, 31000) микротитрационных планшетах Maxisorp (Nunc, 430341). Альтернативно, фаговые библиотеки инкубировали в растворе с 10 нМ биотинилированного пептида, а затем иммобилизовали на комплексах "пептид-фаг" на сферах Dynabeads, покрытых стрептавидином (Invitrogen, 112-06D). Блокирование осуществляли с использованием PBS, в который был добавлен 1% казеин. Затем добавляли фаги, полученные из библиотек, и инкубировали в течение 1 ч (в PBS, в который были добавлены 0,1% казеин и 0,1% Твин-20). Несвязанные фаги отмывали (PBS, в который был добавлен 0,05% Твин-20), а связанный фаг

элюировали добавлением трипсина (1 мг/мл в PBS) в течение 15 мин. Последующие раунды отбора проводили, в основном, как описано выше.

Отбор с использованием мембранных экстрактов осуществляли путем покрытия пробирок для иммуноанализа (Nunc, 444474) 50 мкг/мл мембранных экстрактов (общего белка), полученных из клеток, экспрессирующих CXCR2 человека (Perkin Elmer, ES-145-M400UA и 6110524400UA). Покрытие мембранными экстрактами, полученными из клеток CHO, экспрессирующих FPR1 человека (Perkin Elmer, 6110527400UA), и используемыми в качестве отрицательного контроля, проводили одновременно. Блокирование осуществляли с использованием PBS, в который было добавлено 4% сухое сепарированное молоко Marvel. Фаги инкубировали в течение 2 ч (в PBS, в который было добавлено 1% сепарированное сухое молоко Marvel). Несвязанные фаги отмывали PBS, а связанные фаги элюировали добавлением трипсина (1 мг/мл в PBS) в течение 15 мин. Последующие раунды отбора осуществляли, в основном, как описано выше. В некоторых случаях фаги, связывающиеся с нерелевантными эпитопами "клеточного фона", подвергали специфическому истощению путем предварительной абсорбции фага в дополнительных пробирках или лунках, покрытых контрольными мембранными экстрактами. Затем проводили инкубирование в лунках, содержащих CXCR2 человека и покрытых мембранными экстрактами, в присутствии контрольного мембранного экстракта в растворе. В других экспериментах после проведения одного или двух раундов отбора на пептидах осуществляли еще один раунд отбора на мембранных экстрактах или наоборот.

В другой серии экспериментов 1-5 млн клеток млекопитающих, экспрессирующих CXCR2 человека или собакоподобных обезьян, инкубировали с фаговыми библиотеками в PBS, в который были добавлены 10% FBS и 1% сухое сепарированное молоко Marvel. Нетрансформированные клеточные линии использовали в качестве негативного контроля. Несвязанные фаги отмывали PBS, а связанный фаг элюировали добавлением трипсина (1 мг/мл в PBS) в течение 15 мин. Последующие раунды проводили, в основном, как описано выше, за исключением того, что в отличие от первого раунда в этих раундах использовали другую "фоновую" клеточную линию.

В других экспериментах фаги инкубировали с мембранными экстрактами или с клетками млекопитающих, экспрессирующих CXCR2, в присутствии 1 мкМ пептидов (см. табл. 5) в растворе, для уменьшения числа фагов, экспрессирующих нанотела, связывающиеся с областями, представленными этими пептидами.

8. Получение периплазматических экстрактов.

Клетки TG-1, находящиеся на стадии экспоненциального роста, инфицировали элюированными фагами, а затем эти клетки высевали на планшеты с агаром LB, содержащим карбенициллин. Клоны, резистентные к карбенициллину, анализировали на присутствие вставки и подтверждали последовательности позитивных клонов. Представляющие интерес клоны культивировали в среде TB, в которую был добавлен карбенициллин, и индуцировали путем добавления IPTG для инициации экспрессии. Такую экспрессию поддерживали в течение 4 ч при 37°C, а затем клетки центрифугировали. Осадок ночных замороженных клеток, полученный из экспрессионных культур *E. coli*, растворяли в PBS (1/10 объема исходной культуры) и инкубировали при 4°C в течение 1 ч при осторожном встряхивании. Затем клетки центрифугировали еще один раз, и супернатант, содержащий белки, секретированные в периплазматическое пространство, оставляли на хранение.

9. Скрининг.

Периплазматические экстракты (описанные выше) подвергали FACS-анализу на конкурентное связывание с GRO- α за связывание с CXCR2 человека. 2×10^5 клеток инкубировали с 1/2 разведением периплазматических экстрактов в FACS-буфере (PBS+10% фетальная бычья сыворотка (Sigma, F7524)) в течение 30 мин при 4°C. Затем добавляли равный объем 6 нМ FMAT Blue-меченного GRO- α человека в FACS-буфере и инкубирование продолжали еще 30 мин при 4°C в темноте. Затем клетки три раза промывали в FACS-буфере и, наконец, ресуспендировали в FACS-буфере. Погибшие клетки окрашивали йодидом пропидия (Sigma, P4170). Затем образцы анализировали на устройстве FACSAray (BD Biosciences). В табл. 7 представлен список нанотел, периплазматические экстракты которых конкурируют с GRO- α за связывание с CXCR2 человека.

Таблица 7

Конкурирование с GRO- α за связывание с CXCR2 человека (периплазматические экстракты)

Название	FACS-анализ на конкурирование с Gro- α (% ингибирования)
126B11	36,9
97A9	85,9
127D1	46,7
137B7	90,3
137A8	55,8
139A8	78,5
139D5	56,8
139H2	50,5
143A5	72,6
143B3	70,8
159B10	75,8
144D1	32,7
145D3	77,9
147A1	58,3
146A6	42,7
145C9	53,5
163D2	86,8
163E3	80,1
2B2	38,1
Слепой контроль	0,4

В другой серии экспериментов периплазматические экстракты анализировали на связывание с пептидом человека из 1-19 аминокислотных остатков с помощью ELISA. Планшеты MaxiSorb (Nunc, 430341) покрывали в течение 2 ч нейтравидином, а затем блокировали в течение 1 ч (PBS, 1% казеином). Затем в эти планшеты в течение 1 ч добавляли 100 нМ биотинилированного пептида 1-19 человека (PBS, 0,1% казеин, 0,05% Твин-20), после чего проводили инкубирование в течение 1 ч с 10-кратными разведениями периплазматических экстрактов. Несвязанные периплазматические экстракты отмывали (PBS, в который был добавлен 0,05% Твин-20), а связанные нанотела детектировали с использованием мышиного анти-мус-антитела (Roche, 11667149001), а затем ПХ-конъюгированного кроличьего антимышиного антитела (Dakocytomation, P02 60). В табл. 8 систематизированы отношения сигнала связывания анти-CXCR2 нанотел к сигналу нерелевантного контрольного нанотела.

Таблица 8

Связывание периплазматических экстрактов с пептидом 1-19 CXCR2 человека

Название	ELISA-анализ на связывание с N-концевыми аминокислотами 1-19 пептида (отношение сигнала связывания к сигналу слепого контроля)
54B12	75,5
53E7	13,3
97A9	0,8
127D1	39,5
137B7	1,0
137A8	1,2
139A8	1,0
139D5	0,8
139H2	1,7
159B10	0,8
163D2	0,5
163E3	0,6
2B2	58,6

Последовательности одновалентных анти-CXCR2 нанотел

143B03	SEQ ID NO. 25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYWMYVWRQAPGKGLDWSAIN AGGDSTYYADPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCATVTRGTAR DLDYWGQGTQVTVSS
139D05	SEQ ID NO. 26	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCALSGRIGSINAMGWYRQVSGQQR ELVAVSRSGGSDIADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLKPEDTAV YYCYAHTSSYSNWRVYNDYWGQGTQVTVSS
146A06	SEQ ID NO. 27	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLTCAASGRIGTINAMGWYRQAPGKQR ELVAVITSGGRIDYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLKPEDTAVY YINVTWVAVYWGQGTQVTVSS
147A01	SEQ ID NO. 28	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRMGNINAMGWYRQAPGKER ELVAKITRGGAIYADSVKGRFTIARDNINLNTAYLQMNDLKPEDTAVYY YNVDGGPSQNYWGQGTQVTVSS
145C09	SEQ ID NO. 29	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQAPGKERE RVSCISGSDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLLKPEDTAV YYCAAYWGLTLRLWMPHRYDYWGQGTQVTVSS
145D03	SEQ ID NO. 30	EVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCAASGLIFRLSGMAWYRQAPGRQR EWWAVLTKDGLHYADPVKGRFTISRDNNAENTWYLQMSLKPEDTAI YYCNTGRYWGQGTQVTVSS
144D01	SEQ ID NO. 31	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGTIGTIRAMGWYRQAPGKQRE LVALITSTGRINYADSVKGRFTIGRDNKNTAYLQMNLLKPEDTAVYY YNIETLRRNYWGQGTQVTVSS
139H02	SEQ ID NO. 32	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYAMGWFRQATGKEREVAAI NKSGGNTHYAGSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLKPEDTAVYYCAASRTN PKPDYWGQGTQVTVSS
139A08	SEQ ID NO. 33	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFRSAMGWLQAPGKEREVAG ISWGGDNSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMSLKPQDTAVYYCAARYR GAAVAGWEYWGQGTQVTVSS
137A08	SEQ ID NO. 34	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTLAYTVGWFRAPGKEREISGIS SSDGYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLKPEDTAVYYCAADRRD CKKGRVSGSWGQGTQVTVSS
143A05	SEQ ID NO. 35	KVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFNYYMAWFRQAQGKEREVAAI STRGSMTKYSDSVQGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKPEDTAVYYCAADPRG SSWFSFGYDYWGQGTQVTVSS
137B07	SEQ ID NO. 36	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGPQKAREWVAGI NSDGTNTYADPVKGRFTISRDNKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYCASGYRGG GTQVTVSS
127D01	SEQ ID NO. 37	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFDKVMGWYRQPPGKQREGVAA IRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNLSRPEDTAVYYCKVNIIRGQ DYWGQGTQVTVSS
126B11	SEQ ID NO. 38	EVQLVESGGGLVQAGGSLTSCAVSGSSFRINTMGWYRRAPGKQRELVAAR DRGGYINYVDSVKGRFTVSRDNKPTMYLQMSLKPEDTAVYYCHAGTQDR TGRNFDHWGQGTQVTVSS
097A09	SEQ ID NO. 39	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQRELVAIT SGGNINYIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLKPEDTAVYYCNAEIVLVGV WTQRARTGNVWGQGTQVTVSS
159B10	SEQ ID NO. 40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSLSMGWFRQAPGKERAFVAA LTRNGGYRYADSVKGRFTISRDVAKKTLYLQMSLKPEDTAVYYCAADSL GSDYLGNTLDYWGQGTQVTVSS
163D02	SEQ ID NO. 41	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREVAAI TWNGGRVFTASVKGRFTISRDNKNTMYLQMSLKPEDTAVYYCAADKDR RTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSS
163E03	SEQ ID NO. 42	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREVAAI TWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQMSLKPEDTAVYYCAAGGS SWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
2B2	SEQ ID NO. 43	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILINAMGWYRQAPGKQRELVRR TRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKNTMYLQMSLKPEDTAVYYCMLDRGGV YWGQGTQVTVSS
54B12	SEQ ID NO. 90	EVQLVESGGGLVQAGGSLTSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQRELVAAR DRGGYINYVDSVKGRFTVSRDNKPTMYLQMSLKPEDTAVYYCHAGTQDR TGRNFDRWGQGTQVTVSS

Примеры характеристики одновалентных нанотел

11. Конструирование одновалентных нанотел.

Нанотела, содержащие ДНК-фрагменты, полученные с помощью ПЦП на функциональных фагмидных клонках с использованием праймеров Fwd-EVQL-MfeI и Rev-TVSS-BstEII (табл. 1), гидролизировали ферментами MfeI и BstEII, лигировали в вектор pAX100 и трансформировали в компетентные клетки

TG-1 *E. coli*. рAX100 представляет собой вектор экспрессии, происходящий от плазмиды рUC119, содержащей промотор LacZ, ген резистентности к канамицину, сайт множественного клонирования и лидерную последовательность OmpA. Кодированная последовательность нанотела и вектор, кодирующий C-концевую с-тус-метку и His6-метку, находятся в одной рамке считывания. Клоны, резистентные к канамицину, анализировали на присутствие вставки, а затем подтверждали последовательности позитивных клонов.

12. Экспрессия в лабораторном масштабе.

Клетки TG-1, содержащие векторы экспрессии, кодирующие представляющие интерес нанотела, культивировали в шейкерных колбах с перегородкой, содержащих среду ТВ плюс 100 мкг/мл канамицина, и индуцировали добавлением 1 мМ IPTG для экспрессии. Экспрессию осуществляли в течение 4 ч при 37°C. После сбора клеток получали периплазматические экстракты и His6-меченные нанотела очищали с помощью аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованным металлом (HisTrap FF Crude, GE Healthcare), а затем обессоливали (HiPrep 26/10, GE Healthcare) или подвергали гель-фильтрации (Superdex 75 HR16/10, GE Healthcare) в PBS.

13. Анализ на лигандное конкурентное связывание.

Очищенные одновалентные анти-CXCR2 нанотела титровали против 3 нМ FMAT-Blue-меченного GRO- α в FACS-анализе на лигандное конкурентное связывание CXCR2 человека и CXCR2 собакоподобных обезьян (табл. 10). Для CXCR2 человека блокирующая активность составляет в интервалах между удвоенными нМ-величинами и суб-нМ-величинами, а для CXCR2 собакоподобных обезьян эта активность составляет в интервалах между величиной нМ и удвоенной величиной нМ.

Таблица 10

Активность в конкурентном связывании одновалентных анти-CXCR2 нанотел с лигандами

	CXCR2 человека		CXCR2 собакоподобных обезьян	
	IC50 (М)	% ингибирования (макс.)	IC50 (М)	% ингибирования (макс.)
137B7	1,11E-09	93,5	NA	NA
163D2	6,95E-09	96,4	1,48E-08	91,0
127D1	3,09E-10	61,1	4,41E-09	82,6
97A9	1,72E-08	93,9	6,41E-08	53,0
163E3	8,96E-09	92,4	1,48E-08	83,5
54B12	8,57E-10	35,0	3,95E-08	63,0
2B2	2,07E-09	42,7	3,16E-08	64,0

NA: активность не могла быть измерена

14. Функциональные анализы с использованием рекомбинантных клеточных линий.

(1) Оценка индуцированного агонистом высвобождения внутриклеточного кальция (FLIPR).

Эритроциты (RBL), экспрессирующие рецептор CXCR2 человека или рецептор CXCR2 собакоподобных обезьян, высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи при 37°C. В день проведения эксперимента в клетки вводили краситель Fluo-4 и оставляли на 30 мин при 37°C, а затем подвергали 30-минутному инкубированию с очищенными одновалентными анти-CXCR2 нанотелами. И наконец добавляли GRO- α на планшет-ридер для флуориметрической визуализации (FLIPR), а затем детектировали флуоресцентный сигнал, соответствующий высвобождению внутриклеточного кальция. Анализ на селективность осуществляли с использованием клеток L2071, экспрессирующих CXCR1 человека. Протокол анализа для CXCR1 был аналогичен протоколу анализа для CXCR2, за исключением того, что в анализе CXCR1 в качестве агониста использовали IL-8. Сумма средних значений IC₅₀ представлена в табл. 11, при этом следует отметить, что ни одно из тестируемых нанотел не обнаруживало какого-либо ингибирования индуцированного агонистом высвобождения внутриклеточного кальция при тестируемых концентрациях рецептора CXCR1 (максимальная концентрация 1 мкМ).

(2) Оценка стимулированной агонистом аккумуляции [³⁵S]GTP γ S.

Очищенные одновалентные анти-CXCR2 нанотела инкубировали в течение 60 мин с GRO- α , GDP, SPA-сферами и с CHO-CXCR2-мембранами, выделенными из клеток CHO, экспрессирующих рецептор CXCR2 человека, в 96-луночном планшете. Затем добавляли [³⁵S]GTP γ S и инкубировали еще 60 мин. И, наконец, планшет центрифугировали, а затем считывали на Topcount. Сумма средних значений IC₅₀ указана в табл. 11.

Величины IC₅₀ для очищенных одновалентных анти-CXCR2 нанотел® в функциональных анализах, проводимых с использованием рекомбинантных клеточных линий

	FLIPR				[³⁵ S]GTPγS	
	CXCR2 человека		CXCR2 собакоподобных обезьян		CXCR2 человека	
	IC ₅₀ (M)	% ингибирования (макс.)	IC ₅₀ (M)	% ингибирования (макс.)	IC ₅₀ (M)	% ингибирования (макс.)
137B7	6.71E-9	100	NA	-	ND	-
163D2	1.91E-9	100	3.72E-8	100	5.32E-8	100
127D1	2.19E-8	100	7.53E-7	100*	1.25E-8	66.0
97A9	3.99E-8	100	6.40E-7	100	5.03E-8	100
163E3	4.43E-8	100	1.58E-7	100	6.47E-8	100
54B12	1.53E-7	100	4.08E-6	100*	1.54E-8	71.8
2B2	4.41e-7	100	3.85E-6	100*	1.03E-7	71.3

*Кривые были ограничены 100% ингибированием, поскольку при тестируемых концентрациях плато не наблюдалось.

NA: активность не могла быть измерена.

ND - не измеряли.

15. Функциональные анализы с использованием первичных нейтрофилов.

(1) Анализ на изменение формы нейтрофилов цельной крови человека (hWBSC).

Донорами были здоровые добровольцы, которые не подвергались системной терапии (группа доноров, Novartis Horsham). Цельную кровь, которую обрабатывали антикоагулянтом, а именно 52 mM EDTA (стерильным), собирали в отношении 1 мл EDTA:9 мл крови. Кровь брали при комнатной температуре и перед использованием предварительно нагревали до 37°C. 80 мкл цельной крови перед стимуляцией хемокином предварительно инкубировали с анти-CXCR2 нанотелами в течение 10 мин при комнатной температуре (10 точек на дозовый ответ (0,03-1,144×10⁻⁷ мкМ); при этом во все лунки добавляли 10 мкл rhGROα (приблизительная концентрация EC₇₀ составляла 2 нМ), за исключением лунки с соединением "ноль", в которую добавляли 10 мкл буфера для анализа на изменение формы клеток. Образцы осторожно встряхивали и инкубировали еще 5 мин при 37°C. Затем пробирки помещали на лед и добавляли 250 мкл охлажденного льдом и оптимизированного раствора CellFix™, после чего пробирки осторожно встряхивали и инкубировали еще 5 мин, а затем во все пробирки добавляли 1,4 мл 1X раствора хлорида аммония для лизиса и эти пробирки оставляли на льду еще на 20 мин. После лизиса эритроцитов образцы анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson). Популяции клеток были идентифицированы по дискриминационному окну прямого рассеяния/бокового рассеяния (FSC/SSC), а затем строили графики для FSC/FL-2 по данным флуоресцентного возбуждения для гранулоцитов, представленным на первом графике. На графике FL-2 нейтрофилы были дифференцированы от эозинофилов, поскольку эозинофилы имеют более высокий уровень аутофлуоресценции. Было подсчитано 5000 сигналов на образец.

(2) Анализ на хемотаксис нейтрофилов человека.

Донорами были здоровые добровольцы, которые не подвергались системной терапии (группа доноров, Novartis Horsham). Цельную кровь, которую обрабатывали антикоагулянтом, а именно 52 mM EDTA (стерильным), собирали в отношении 1 мл EDTA:9 мл крови. Лейкоциты выделяли в соответствии со стандартными протоколами: к 20 мл крови, обработанной антикоагулянтами, добавляли 4% декстран, осторожно смешивали, а затем инкубировали на льду в течение 30 мин для осаждения эритроцитов. Затем супернатант-содержащие мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) наносили слоем на Фиколл-Пак® в градиенте плотности и центрифугировали при 300×g в течение 25 мин при 18°C. МКПК-богатую фракцию ресуспендировали в 500 мкл 1× PBS, и осуществляли лизис эритроцитов с использованием белков гипотонического шока. К осадку добавляли 20 мл охлажденной льдом стерильной дистиллированной воды, не содержащей эндотоксинов, и смесь оставляли для лизиса на 30-40 с, после чего добавляли 20 мл 2× PBS. Образец осторожно смешивали и центрифугировали при 300×g в течение 10 мин при 18°C с получением гранулоцитов. Гранулоцитарный осадок ресуспендировали в 500 мкл 1× PBS и два раза промывали 50 мл 1× PBS. Затем гранулоцитарный осадок ресуспендировали в среде RPMI 1640, pH 7,4, плюс 2,5% FBS, подсчитывали и разводили до конечной концентрации 2e⁶/мл. Миграцию оценивали на планшетах Transwell, содержащих 3 мкм PET-мембран от Becton Dickinson. Вкратце, перед помещением мембраны для многолучного планшета в нижнее положение на дно лунок планшета (1000 мкл/лунку) добавляли 6 нМ GRO-α (EC₈₀-EC100), а затем на эту мембрану добавляли МКПК (500 мкл/лунку), которые были предварительно инкубированы с различными концентрациями нанотела (0,13-1000 нМ для одновалентных нанотел или 0,6 пМ-30 нМ для бипаратопных нанотел) в течение 30 мин при

комнатной температуре. Затем планшеты инкубировали при 37°C в течение 90 мин и клетки, которые мигрировали на дно камеры для хемотаксиса, подсчитывали на проточном цитометре FACSCalibur. Проточный цитометр был установлен на число сигналов в дискриминационном окне R2, исходя из графика FSC/FL-2, за установленное время 20 с на образец.

(3) Анализ на изменение формы нейтрофилов цельной крови собакоподобных обезьян (СуноWBSC).

Венозную кровь, взятую либо из предплечья, либо из нижней конечности, обрабатывали антикоагулянтом 3,8% цитрата натрия (стерильного) в отношении 1 мл цитрата натрия : 9 мл крови. Кровь брали при комнатной температуре и перед использованием предварительно нагревали до 37°C. 80 мкл цельной крови перед стимуляцией хемокином предварительно инкубировали с анти-CXCR2 нанотелами в течение 10 мин при комнатной температуре (10 точек на дозовый ответ (0, 03-1, 144×10^{-7} нМ); при этом во все лунки добавляли 10 мкл rhGRO α (приблизительная концентрация EC₇₀₋₉₀ составляла 30 нМ), за исключением лунок с соединением "ноль", в которые добавляли 10 мкл буфера для анализа на изменение формы клеток. Образцы осторожно встряхивали и инкубировали еще 5 мин при 37°C. Затем пробирки помещали на лед и добавляли 250 мкл охлажденного льдом и оптимизированного раствора CellFix™, после чего пробирки осторожно встряхивали и инкубировали еще 5 мин, а затем во все пробирки добавляли 2 мл буфера для лизиса (Sigma Aldrich #R7757), эти пробирки оставляли на льду еще на 40-60 мин. После лизиса эритроцитов образцы анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson). Популяции клеток были идентифицированы по дискриминационному окну прямого рассеяния/бокового рассеяния (FSC/SSC), а затем строили графики для FSC/FL-2 по данным флуоресцентного возбуждения для гранулоцитов, представленным на первом графике. На графике FL-2 нейтрофилы были дифференцированы от эозинофилов, поскольку эозинофилы имеют более высокий уровень аутофлуоресценции. Было подсчитано 5000 сигналов на образец.

Таблица 12

Величины IC₅₀ для очищенных одновалентных анти-CXCR2 нанотел в функциональных анализах, проводимых с использованием первичных нейтрофилов и rhGRO α

	WBSC человека IC ₅₀ (нМ)	WBSC собакоподобных обезьян IC ₅₀ (нМ)	Хемотаксис у человека IC ₅₀ (нМ)
163D2	6, 6±3, 1	>100	
127D1	4, 9±2, 9	>100	3, 9
97A9	11, 6±5, 47	>100	4, 8
163E3	9, 4±6, 2	>100	1, 3
54B12	19, 7	>100	
2B2	29, 5±23, 4	>100	50

Мультивалентные нанотела.

16. Конструирование двухвалентных нанотел.

Для конструирования двухвалентных нанотел были применены два подхода.

ПЦР-амплификацию проводили на плазмидной ДНК, кодирующей одновалентные структурные блоки. N-концевой структурный блок амплифицировали с использованием Fwd-EVQL-MfeI и обратного праймера, кодирующего часть линкера GlySer, а C-концевой структурный блок амплифицировали с использованием прямого праймера, кодирующего остальную часть линкера GlySer и Rev-TVSS-BstEII (табл. 6). N-концевой фрагмент гидролизовали ферментами MfeI и BamHI, а C-концевой фрагмент гидролизовали ферментами BamHI и BstII, после чего эти фрагменты одновременно лигировали в вектор pAX100 и вводили в компетентные клетки TG-1 E. coli.

Альтернативно, различные ПЦР-амплификации проводили на плазмидной ДНК, кодирующей одновалентные структурные блоки. N-концевой структурный блок амплифицировали с использованием Fwd-EVQL-MfeI и Rev-TVSS-BspEI, а C-концевой структурный блок амплифицировали с использованием Fwd-EVQL-BamHI и Rev-TVSS-BstEII (табл. 6). N-концевой фрагмент гидролизовали ферментами MfeI и BamHI, а C-концевой фрагмент гидролизовали ферментами BspEI и BstII. N-концевой фрагмент лигировали (MfeI-BspEI) в pAX100-производное, содержащее последовательность, кодирующую линкер GlySer, и вводили в компетентные клетки TG-1 E. coli. Затем из смеси для трансформации получали плазмидную ДНК, и полученную ДНК гидролизовали ферментами BspEI и BstEII, после чего C-концевой фрагмент лигировали в вектор pAX100 и вводили в компетентные клетки TG-1 E. coli.

Резистентные к канамицину клоны анализировали на присутствие вставки и подтверждали последовательности позитивных клонов.

		LRLSCAASGILTINAMGWYRQAPGKQRELVRRTRGGSTTYQDSVKG RFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVT SS
CXCR2002 0	127D1-35GS- 163D2 SEQ ID NO. 53	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFDKVMGWYRQPPGKQRE GVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYY CKVNIRGQDYWGQGTQVTSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFDYAM GWFRQAPGKEREVAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNKNTMYL QMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTSS
CXCR2002 1	127D1-35GS- 163E3 SEQ ID NO. 54	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFDKVMGWYRQPPGKQRE GVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYY CKVNIRGQDYWGQGTQVTSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRIFSSNAM GWFRQAPGKEREVAAITWRSAGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTMYL QMNSLKPEDTAVYYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTSS
CXCR2002 2	163D2-35GS- 163D2 SEQ ID NO. 55	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFDYAMGWFRQAPGKERE FVAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTSSGGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS GRFTFDYAMGWFRQAPGKEREVAAITWNGGRVFYASVKGRFTISR DNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGT QVTSS
CXCR2002 3	163D2-35GS- 163E3 SEQ ID NO. 56	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFDYAMGWFRQAPGKERE FVAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTSSGGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVAS GRIFSSNAMGWFRQAPGKEREVAAITWRSAGSAYYADSAKGRFTISR DNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVT SS
CXCR2002 4	163E3-35GS- 163E3 SEQ ID NO. 57	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKERE VAAITWRSAGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVY YCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTSSGGGGSGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGR IFSSNAMGWFRQAPGKEREVAAITWRSAGSAYYADSAKGRFTISR DNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTSS
CXCR2002 5	163D2-35GS- 127D1 SEQ ID NO. 58	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFDYAMGWFRQAPGKERE FVAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTSSGGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAAS GSTFDKVMGWYRQPPGKQREGVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKA NAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQVTSS
CXCR2002 6	163E3-35GS- 127D1 SEQ ID NO. 59	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKERE VAAITWRSAGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVY YCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTSSGGGGSGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASG STFDKVMGWYRQPPGKQREGVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAK NTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQVTSS
CXCR2002 7	163E3-35GS- 163D2 SEQ ID NO. 60	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKERE VAAITWRSAGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVY YCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTSSGGGGSGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGR FTFDYAMGWFRQAPGKEREVAAITWNGGRVFYASVKGRFTISR DNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVT SS
CXCR2002 8	97A9-35GS- 54B12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNA

Анализ на лигандное конкуррирование мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

		CXCR2 человека		CXCR2 собакоподобных обезьян	
		IC50 (M)	% ингибирования (макс.)	IC50 (M)	% ингибирования (макс.)
CXCR20011	97A9-35GS-97A9	3.52E-08	99.0	9.74E-08	60.0
CXCR20012	137B7-35GS-137B7	6.06E-10	99.1	ND	ND
CXCR20013	2B2-35GS-97A9	9.00E-10	90.0	4.20E-09	98.5
CXCR20014	97A9-35GS-2B2	1.59E-09	99.7	3.90E-09	98.5
CXCR20015	2B2-35GS-137B7	7.00E-10	99.0	9.90E-08	81.5
CXCR20016	137B7-35GS-2B2	8.00E-10	100.0	5.70E-09	88.0
CXCR20017	97A9-35GS-137B7	3.40E-09	99.0	2.95E-08	73.0
CXCR20018	137B7-35GS-97A9	1.90E-09	98.0	5.08E-08	47.0
CXCR20019	2B2-9GS-2B2	4.40E-11	50.6	1.8E-09	81.0
CXCR20020	127D1-35GS-163D2	9.90E-10	100.0	1.78E-09	98.5
CXCR20021	127D1-35GS-163E3	1.09E-09	99.5	1.85E-09	98.5
CXCR20022	163D2-35GS-163D2	4.14E-09	100.0	8.01E-09	98.0
CXCR20023	163D2-35GS-163E3	4.28E-09	99.0	6.61E-09	96.0
CXCR20024	163E3-35GS-163E3	5.27E-09	99.0	5.32E-09	95.0
CXCR20025	163D2-35GS-127D1	9.00E-10	99.0	2.08E-09	98.5
CXCR20026	163E3-35GS-127D1	9.00E-10	99.5	1.82E-09	99.0
CXCR20027	163E3-35GS-163D2	4.90E-09	100.0	6.42E-09	97.0
CXCR20028	97A9-35GS-54B12	1.63E-09	98.5	3.80E-09	96.0
CXCR20029	163E3-35GS-54B12	1.13E-09	98.5	2.09E-09	98.5
CXCR20030	163D2-35GS-54B12	7.86E-10	99.5	1.74E-09	98.5
CXCR20031	2B2-35GS-163E3	4.90E-10	100.0	1.98E-09	99.0
CXCR20032	2B2-35GS-163D2	5.00E-10	100.0	1.91E-09	99.0
CXCR20033	163E3-35GS-2B2	6.50E-10	100.0%	2.20E-09	99.0%
CXCR20034	163D2-35GS-2B2	8.00E-10	100.0%	2.55E-09	99.0%
CXCR20035	54B12-35GS-163E3	1.00E-09	99.0%	3.23E-09	99.0%
CXCR20036	54B12-35GS-163D2	7.00E-10	98.0%	2.27E-09	98.0%

ND: не определяли.

19. Функциональные анализы с использованием рекомбинантных клеточных линий.

(1) Оценка индуцированного агонистом высвобождения внутриклеточного кальция (FLIPR).

Эритроциты (RBL), экспрессирующие рецептор CXCR2 человека или рецептор CXCR2 собакоподобных обезьян, высеивали в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи при 37°C. В день проведения эксперимента в клетки вводили краситель Fluo-4 и оставляли на 30 мин при 37°C, а затем подвергали 30-минутному инкубированию с очищенными мультивалентными анти-CXCR2 нанотелами. И, наконец, осуществляли добавление GRO- α с использованием планшет-ридера для флуориметрической визуализации (FLIPR), а затем детектировали флуоресцентный сигнал, соответствующий высвобождению внутриклеточного кальция. Анализы на селективность осуществляли с использованием клеток L2071, экспрессирующих CXCR1 человека, и IL-8 в качестве агониста, а также клеток СЕМ, эндогенно экспрессирующих CXCR4 человека, и SDF-1 в качестве агониста, при этом протокол анализа был аналогичен протоколу анализа, описанного для CXCR2. Сумма средних величин IC₅₀ представлена в табл. 15. При этом следует отметить, что ни одно из тестируемых нанотел не обнаруживало какого-либо ингибирования индуцированного агонистом высвобождения внутриклеточного кальция при тестируемых концентрациях CXCR1 или CXCR4 (максимальная концентрация 1 мкМ).

(2) Оценка стимулированной агонистом аккумуляции [³⁵S]GTP γ S.

Очищенные мультивалентные анти-CXCR2 нанотела инкубировали в течение 60 мин с агонистом (GRO- α , IL-8 или ENA-78) GDP, SPA-сферами и с CHO-CXC2-мембранами, выделенными из клеток CHO, экспрессирующих рецептор CXCR2 человека, в 96-луночном планшете. Затем добавляли [³⁶S]GTP γ S и инкубировали еще 60 мин. И, наконец, планшет центрифугировали, а затем считывали на Topcount. Сумма средних значений IC₅₀ указана в табл. 15.

Величины IC_{50} для очищенных мультивалентных анти-CXCR2 нанотел в функциональном анализе, проводимом для оценки высвобождения внутриклеточного кальция с использованием рекомбинантных клеточных линий

		CXCR2 человека		CXCR2 собакоподобных обезьян	
		IC_{50} (M)	% ингибирования (макс.)	IC_{50} (M)	% ингибирования (макс.)
CXCR20011	97A9-35GS-97A9	1.37E-7	100	ND	ND
CXCR20012	137B7-35GS-137B7	ND	ND	ND	ND
CXCR20013	2B2-35GS-97A9	2.93E-9	100	2.92E-8	100
CXCR20014	97A9-35GS-2B2	6.84E-9	100	1.37E-8	100
CXCR20015	2B2-35GS-137B7	2.78E-9	100	2.87E-6	100*
CXCR20016	137B7-35GS-2B2	2.36E-9	100	1.10E-6	100*
CXCR20017	97A9-35GS-137B7	2.29E-8	100	1.08E-6	100*
CXCR20018	137B7-35GS-97A9	ND	ND	ND	ND
CXCR20019	2B2-9GS-2B2	ND	ND	ND	ND
CXCR20020	127D1-35GS-163D2	6.98E-9	100	1.64E-9	100
CXCR20021	127D1-35GS-163E3	7.32E-9	100	2.31E-9	100
CXCR20022	163D2-35GS-163D2	9.34E-9	100	8.64E-9	100
CXCR20023	163D2-35GS-163E3	1.48E-8	100	1.20E-8	100
CXCR20024	163E3-35GS-163E3	2.64E-8	100	1.18E-8	100
CXCR20025	163D2-35GS-127D1	1.22E-8	100	7.88E-9	100
CXCR20026	163E3-35GS-127D1	1.23E-8	100	9.10E-9	100
CXCR20027	163E3-35GS-163D2	1.78E-8	100	1.27E-8	100
CXCR20028	97A9-35GS-54B12	2.19E-8	100	1.70E-8	100
CXCR20029	163E3-35GS-54B12	1.71E-8	100	1.01E-8	100
CXCR20030	163D2-35GS-54B12	1.18E-8	100	6.36E-9	100
CXCR20031	2B2-35GS-163E3	1.52E-8	100	4.26E-9	100
CXCR20032	2B2-35GS-163D2	1.47E-8	100	3.65E-9	100
CXCR20033	163E3-35GS-2B2	1.79E-8	100	4.46E-9	100
CXCR20034	163D2-35GS-2B2	1.18E-8	100	9.47E-9	100
CXCR20035	54B12-35GS-163E3	1.02E-8	100	8.72E-9	100
CXCR20036	54B12-35GS-163D2	7.86E-9	100	4.27E-9	100

*Кривые были ограничены 100% ингибированием, поскольку при тестируемых концентрациях плато не наблюдалось.
ND - не определяли.

Величины IC_{50} для очищенных мультивалентных анти-CXCR2 нанотел в функциональном анализе, проводимом для оценки аккумуляции $[35S]GTP\gamma S$ в мембранах клеток CHO, содержащих CXCR2 человека

		CXCR2 человека (анализ с использованием различных агонистов)					
		GRO- α		IL-8		ENA-7B	
		IC_{50} (M)	% ингибирования (макс.)	IC_{50} (M)	% ингибирования (макс.)	IC_{50} (M)	% ингибирования (макс.)
CXCR20014	97A9-35GS-2B2	1.38E-9	100	1.13E-9	100	1.66E-9	100
CXCR20020	127D1-35GS-163D2	6.34E-10	100	6.19E-10	100	7.07E-10	100
CXCR20021	127D1-35GS-163E3	5.51E-10	100	8.27E-10	100	7.87E-10	100
CXCR20022	163D2-35GS-163D2	2.85E-8	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20023	163D2-35GS-163E3	2.66E-8	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20024	163E3-35GS-163E3	3.03E-8	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20025	163D2-35GS-127D1	8.91E-10	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20026	163E3-35GS-127D1	8.09E-10	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20028	97A9-35GS-54B12	1.38E-9	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20030	163D2-35GS-54B12	1.02E-9	100	1.09E-9	100	1.30E-9	100
CXCR20031	2B2-35GS-163E3	ND	ND	8.40E-10	100	1.38E-9	100
CXCR20032	2B2-35GS-163D2	ND	ND	9.97E-10	100	1.16E-10	100
CXCR20033	163E3-35GS-2B2	1.01E-9	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20034	163D2-35GS-2B2	9.95E-10	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20035	54B12-35GS-163E3	8.44E-10	100	7.17E-10	100	1.17E-9	100

ND - не определяли.

(3) Анализ Шильда для определения механизма действия анти-CXCR2 нанотел.

Анализ Шильда осуществляли путем проведения анализов на IL-8- и GRO- α -стимулированную аккумуляцию [^{35}S]GTP γ S. Формат этого анализа позволяет уравнивать агонист и нанотело перед добавлением [^{35}S]GTP γ S, что позволяет предотвратить образование каких-либо артефактов неполного равновесия, которые могут давать ошибочную интерпретацию этого механизма. Для этого строили кривые зависимости "концентрация агониста-ответ" с использованием возрастающих концентраций нанотела. Данные для двух одновалентных нанотел 54B12 и 163E3 и данные, полученные для мультивалентного нанотела, приводятся в качестве примеров и представлены на фиг. 1. Эти данные представляют собой кривые "концентрация-ответ" для GRO- α , и аналогичные данные были получены с использованием IL-8.

Одновалентные нанотела 54B12 и 163E3 обнаруживают одинаковые аллостерические механизмы действия, но по-разному влияют на ингибирование агониста. Аллостерический механизм действия нанотела 54B12 и других связывающих агентов 1-19 проиллюстрирован параллельными сдвигами вправо на кривой зависимости "концентрация агониста-ответ" при низких концентрациях нанотела, но в присутствии возрастающих концентраций нанотела сдвигов вправо больше не наблюдалось (фиг. 1(a)). Эффект насыщения такого механизма без снижения максимального ответа агониста является показателем аллостерического действия на аффинность агониста. В противоположность этому аллостерические механизмы действия 163E3 и других связывающих агентов 1-19 проиллюстрирован параллельными сдвигами вправо на кривой зависимости "концентрация агониста-ответ" в комбинации со снижением максимального ответа агониста при более высоких концентрациях нанотела (фиг. 1(b)). Такой эффект может быть насыщаемым, но он не наблюдался при используемых концентрациях, однако важным наблюдением является снижение максимального ответа агониста, которое указывает на аллостерический механизм действия в отношении эффективности агониста. И, наконец, мультивалентное нанотело 54B12-163E3 действует по обоим аллостерическим механизмам и влияет на кривую "концентрация агониста-ответ", которая представлена параллельными сдвигами вправо при гораздо меньших концентрациях нанотел и значительным снижением максимального ответа агониста. (фиг. 1(c)).

В настоящее время аллостерический модулятор определяют как модулятор, который связывается в сайте, отличающемся от сайта связывания агониста (ортостерического лиганда), а это означает, что ортостерический лиганд и аллостерический модулятор связываются с рецептором одновременно. В настоящее время авторы данного изобретения не располагают данными, подтверждающими этот факт, а поэтому, не претендуя на какую-либо конкретную теорию, авторы отмечают, что сайт связывания нанотела необязательно отличается от сайта связывания агониста, а, по всей вероятности, эти сайты связывания перекрываются. Также не существует данных, указывающих на то, что агонист и нанотело связываются с рецептором одновременно, хотя данные анализа Шильда позволяют предположить, что эти нанотела являются аллостерическими модуляторами CXCR2.

20. Функциональные анализы - NSC.

Эти анализы проводились методами, описанными в разделе 15.

Таблица 17

Величины IC₅₀ для очищенных бипаратопных анти-CXCR2 нанотел в функциональных анализах, проводимых с использованием первичных нейтрофилов человека или собакоподобных обезьян (и ghGRO α , среднее \pm ср. кв. от.)

	WBSC человека IC ₅₀ (нМ)	WBSC собакоподобных обезьян IC ₅₀ (нМ)	Хемотаксис у человека IC ₅₀ (нМ)
97A9-2B2	0,445 \pm 0,08	0,16 \pm 0,16	0,16
163D2-2B2	0,29 \pm 0,17	0,44 \pm 0,14	0,145
163E3-2B2	0,345 \pm 0,15	0,42 \pm 0,12	0,145
127D1-163D2	0,17	0,12 \pm 0,09	0,145
163E3-127D1	0,165 \pm 0,06	0,26 \pm 0,25	0,14
97A9-54B12	0,43 \pm 0,18	1,72 \pm 0,43	
163D2-54B12	0,215 \pm 0,02	0,56 \pm 0,46	
54B12-163E3	0,24 \pm 0,155	0,43 \pm 0,38	

143B03	SEQ ID NO. 192	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTC AGTACCTACTGGATGTATTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGG GCTCGACTGGGTCTCAGCTATTAATGCTGGTGGTGATAGCACAT ACTATGCAGACCCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGAC AACAAACAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAACC TGAGGACACGGCCCTGTATTACTGTGCGACCGTACGAGGCACA GCTCGTGACTTGGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCG TCTCCTCA</p>
139D05	SEQ ID NO. 193	<p>GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCACTCTCTGGAAGGATCGGC AGTATCAACGCCATGGGCTGGTATCGCCAGGTTTCAGGACAACA GCGCGAGTTGGTCGCAGTAAGCAGGAGCGGAGGTAGCACAGAC ATTGCTGACTCCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA CGGCAAGAACACAGTGTATCTGCAGATGGACAGCCTGAAACCTG AGGACACGGCCGTCTATTACTGTTATGCTCATACTTCAAGCTATA GTAATTGGCGAGTCTACAATAACGACTACTGGGGCCAGGGGACC CAGGTCACCGTCTCCTCA</p>
146A06	SEQ ID NO. 194	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTTACCTGTGCAGCCTCTGGACGCATCGG CACTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAG CAGCGCGAGTTGGTCGCAGTTATTACTAGTGGTGGTAGGATAGA CTATGCAGACTCCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACA ATGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCT GAGGACACGGCCGTCTATTACTATAATGTAGAAACGGTAGTGGG TGCCGTCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA</p>

147A01	SEQ ID NO. 195	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGGATGGG CAATATCAATGCCATGGGCTGGTATCGCCAGGCTCCAGGGAAGG AGCGCGAGTTGGTCGAAAAATTAAGGGGTGGTGCATAACC TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCGCCAGAGACAA TATTCTGAACACGGCGTATCTGCAAATGAACGACCTGAAACCTGA GGACACGGCCGTCATTATTATAATGTAGATGGGGGGCCAGTC AAAACACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCA</p>
145C09	SEQ ID NO. 196	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTC GATGATTATGCCATAGGCTGGTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGG AGCGTGAGAGGGTCTCATGTATTAGTGGTAGTGATGGTAGCACA TACTATGCAGACTCCGTCAAGGGCCGATTACCATCTCCAAGTGA CAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAAC CCGAGGACACGGCCGTTTATTATTGTGCAGCATATTGGGGACTA ACGCTCAGGCTATGGATGCCCGCCACCCGGTATGACTACTGGG GCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCA</p>
145D03	SEQ ID NO. 197	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGCCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTTATCTTC AGACTCAGTGGCATGGCCTGGTATCGCCAGGCTCCGGGGAGGC AGCGCGAGTGGTGCAGTGCTTACCAAAGATGGTACCCTACAC TATGCAGACCCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAAACAA CGCCGAGAACACGTGGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG AGGACACAGCCATCTATTACTGTAATACGGGCCGTTACTGGGGC CAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCA</p>
144D01	SEQ ID NO. 198	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCACTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAACCATCGG CACGATCAGAGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAG CAGCGCGAGTTGGTCGCATTGATTACTAGTACTGGTAGGATAAA CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATTGGAAGAGACA ATGCCAAGAACACGGCGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAACCT GAGGACACGGCCGCTATTACTATAATATCGAAACACTACGACGT AACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCA</p>
139H02	SEQ ID NO. 199	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTT AGTAACTATGCCATGGGCTGGTTCGCCAGGCCACAGGGAAGG AGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTAACAAGAGTGGTGGGAACACA CACTATGCAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTAGGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCGTCGCGGACTAAC</p>

		CCTAAGCCTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
139A08	SEQ ID NO. 200	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCTCCTCAGTCGAGTGCCATGGGCTGGCTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAATTTGTAGCAGGTATTAGCTGGGGTGGTGATAACTCA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACCGTGTCTCTACAAATGAACAGCCTGAAACCTCAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAAGATACCGGGGAGGCGGGCAGTAGCTGGTTGGGAGTACTGGGGCCAGGGGACCAGGTACCCGTCTCCTCA
137A08	SEQ ID NO. 201	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACTTTGCCCTATTATACCGTAGGCTGGTTCCGCCGGGCCCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGATCTCATGTATTAGTAGTAGTGGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAATACGGTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGGGCTGACAGACGTACC GACTGTAAAAAGGGTAGAGTCGGTTCTGGTTCTGGGGCCAGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
143A05	SEQ ID NO. 202	AAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGGCTGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGACGCGCCTTCAATTACTATGTATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCAAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTAGCACGCGTGGTAGTATGACAAAGTATTCAGACTCCGTGCAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACCGTGTATCTGCACATGAACAGCCTGAAA CCTGAGGATACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAGACCCTCGCGGCAGTAGCTGGTCATTTTCGTCCGGGGGTTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
137B07	SEQ ID NO. 203	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGTCTGTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGAATCATCTCAGACTCAGTGCCTGGGTTGGACACGCCAGGCTCCAGGAAAGGCGCGCAGTGGGTCGCAGGTATTACAGTGATGGTACGACCAA CTACGCCGACCCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGATATATCTGCACATGGACATGCTGAAACCTGAGGATACGGCCGTTTATTACTGTGCCTCCGGAAAGTACCGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
127D01	SEQ ID NO. 204	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGAGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCACCTTGATTTCAAAGTCATGGGCTGGTACCGCCAGCCTCCAGGGAAGCAGCGAGGGGTCGCAGCGATTAGGCTTAGTGGAACATGCAC

		TATGCAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAAAGCCAA CGCCAAGAACACAGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTG AGGACACGGCCGTCTATTACTGTAAGGTGAACATTCGGGGCCAG GACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
126B11	SEQ ID NO. 205	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGTCTCTGAGCTCTCCTGTGCAGTCTTGAAGCTCCTC AGAATCAATACCATGGGCTGGTACCGCCGGGCTCCAGGGAAGC AGCGCAGTTGGTCGCAGCTCGTATAGAGGTGGTTACATAAAC TATGTAGATTCCGTGAAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGACAA CGCCAAGCCACAATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG AGGACACGGCCGTCTATTATTGTCATGCCGGGACCCAAGATCGG ACGGGTCCGAATTCGACCACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCA CCGTCTCCTCA
097A09	SEQ ID NO. 206	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGAAGCATCGTC AGAATTAATACCATGGGCTGGTACCGCCAGACTCCAGGGAAGCA GCGCGAGTTGGTCGCAGATATTACAGTGGTGGTAACATAAACT ATATAGACGCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA ACCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGA GGACACGGCCGTCTATTACTGTAATGCAGAGATCGTTGTTCTGG TGGGAGTTTGGACCCAGCGTGC CGGACCGGCAACTACTGGGG CCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
159B10	SEQ ID NO. 207	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCCTG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACGTTT AGTAGCTTGTCCATGGGCTGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGG AGCGTGCCTTTGTAGCAGCGCTTACTCGAAATGGTGGTTACAGA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGA CGTCGCCAAGAAGACCTTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCAGATAGTCTTAGT GGTAGTACTACTTAGGAACCAACCTAGACTACTGGGGCCAGGG GACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
163D02	SEQ ID NO. 208	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTC AGTGACTATGCCATGGGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG AGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTACGTGGAATGGTGGTAGAGTA TTTTATACTGCCGCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGA CAACGCCAAGAACACGATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAGATAAAGACAGA CGTACTGACTATCTAGGGCACCCCGTTGCCTACTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
163E03	SEQ ID NO. 209	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCCTG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGACGCATCTTC

		AGTAGCAATGCCATGGGCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGG AGCGTGAGTTTGTAGCGGCCATTACCTGGAGGAGTGGCGGTAG CGCGTACTATGCAGACTCCGCGAAGGGCCGATTACCATCTCCA GAGACAACGCCAAGAACACGGGTGATTTGCAAATGAACAGCCTG AAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTATTGTGCAGCTGGTGGTAG TTCTGTAAAGTTTTCGCCGGACTACTGGGGCCAGGGGACCC AGGTACCCTCTCCTCA
2B2	SEQ ID NO. 210	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGAGTTGGTGCAGCCG GGGGGTCTCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTT AACTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAG CAGCGCGAGTTGGTAGTCCGTAGGACTAGGGGTGGTAGTACAA CGTATCAAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCGCAGAC ATTGCCAAGAAACGATGATCTCCAATGAACAGCCTGAAACCT GAAGACACGGCCGCTATTACTGTATGCTAGATGACCGTGGGG TGCTACTGGGGTCAAGGGACCCAGGTACCCTCTCCTCA
54B12	SEQ ID NO. 211	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGACGCTCTCTGTGCAGTCTCTGGAAGCACCTTC AGAATCAATACCATGGGCTGGTACCGCCGGGCTCCAGGGAAGC AGCGCGAGTTGGTGCAGCTCGTGATAGAGTGGTACATAAAC TATGTAGATTCCGTGAAGGGCCGATTACCCTCTCCAGACAAA CGCCAAGCCACAATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG AGGACACGGCCGCTATTATTGTATGCTAGATGACCGTGGGG ACGGGTCCGAATTCGACCGCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCA CCGTCTCCTCA

Основная панель антител - CDR + FR CXCR2, пронумерованных по Kabat.

Таблица 19

	каркасная область 1	CDR1	каркасная область 2	CDR2	каркасная область 3	CDR3	каркасная область 4
143B03	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS SEQ ID NO. 70	TYWMY SEQ ID NO. 132	WVRQAPGKGLDWS S SEQ ID NO. 91	AINAGDSTYYADPV KG SEQ ID NO. 152	RFTISRDNKNTLYLQMNLSK KQ SEQ ID NO. 111	VRGTARDLDY SEQ ID NO. 172	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
139D05	EVQLVDSGGGLVQAGGSLRLS CALSGRIGS SEQ ID NO. 71	INAMG SEQ ID NO. 133	WYRQVSGQREL A SEQ ID NO. 92	VSRGGSTDIADSVK G SEQ ID NO. 153	RFTISRDNKNTLYLQMNLSK PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 112	HTSSYSNWRVYNNDY SEQ ID NO. 173	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
145C09	EVQLVDSGGGLVQAGGSLRLS CAASGFTFD SEQ ID NO. 72	DYALG SEQ ID NO. 134	WFRQAPGKERERV S SEQ ID NO. 93	CISGSGSTYYADSV KG SEQ ID NO. 154	RFTISRDNKNTLYLQMNLSK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 113	YWGLTLRLWMPHRYDY SEQ ID NO. 174	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
145D03	EVQLVDSGGGLVQAGGSLRLS CAASGLIFR SEQ ID NO. 73	LSGMA SEQ ID NO. 135	WYRQAPGQREWV A SEQ ID NO. 94	VLTKDGTLYADPVK G SEQ ID NO. 155	RFTISRDNKNTLYLQMNLSK PEDTAVYYCNT SEQ ID NO. 114	GRY SEQ ID NO. 175	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
139H02	EVQLVDSGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 74	NYAMG SEQ ID NO. 136	WFRQAPGKREFV A SEQ ID NO. 95	AINKSGGNTYVAGSV KG SEQ ID NO. 156	RFTISRDNKNTLYLQMNLSK PRDTAVYYCAA SEQ ID NO. 115	SRTNPKPDY SEQ ID NO. 176	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
139A08	EVQLVDSGGGLVQAGGSLRLS CAASGRSFS SEQ ID NO. 75	RSAMG SEQ ID NO. 137	WLRQAPGKREFV A SEQ ID NO. 96	GISWGGDNTYADSV KG SEQ ID NO. 157	RFTISRDNKNTLYLQMNLSK PQDTAVYYCAA SEQ ID NO. 116	RYRGGAAVAGWEY SEQ ID NO. 177	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
137A08	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS CAASGTLA SEQ ID NO. 76	YYTVG SEQ ID NO. 138	WFRAPGKEREIGI S SEQ ID NO. 97	CISGSGSTYYADSV S SEQ ID NO. 158	RFTISRDNKNTLYLQMNLSK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 117	DRRTDCKKRGVSGGS SEQ ID NO. 178	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
143A05	EVQLVDSGGGLVQAGGSLRLS CAASGRAFN SEQ ID NO. 77	YYVMA SEQ ID NO. 139	WFRQAGKEREV A SEQ ID NO. 98	AISTRGSMTHYADSV QG SEQ ID NO. 159	RFTISRDNKNTLYLHMNSLK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 118	DPRGSSWFSFSGGYDY SEQ ID NO. 179	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
137B07	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS CVASGLIFR SEQ ID NO. 78	LSALG SEQ ID NO. 140	WTRQAPGKAREWV A SEQ ID NO. 99	CINSDGNTYADPVK G SEQ ID NO. 160	RFTISRDNKNTLYLHMNSLK PEDTAVYYCAS SEQ ID NO. 119	GKY SEQ ID NO. 180	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
127D01	EVQLVDSGGGLVQAGGSLRLS CAASGTFD SEQ ID NO. 79	PKVMG SEQ ID NO. 141	WYRQAPGKQREGV A SEQ ID NO. 100	ATRLSGNMHYADSVK G SEQ ID NO. 161	RFTISRDNKNTLYLQMNLSK PEDTAVYYCKV SEQ ID NO. 120	NIRGGDY SEQ ID NO. 181	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
126B11	EVQLVDSGGGLVQAGGSLRLS CAVSGSFR SEQ ID NO. 80	INTMG SEQ ID NO. 142	WYRRAPGKQREL V SEQ ID NO. 101	ARDRGGYINVDVSK G SEQ ID NO. 162	RFTISRDNKNTLYLQMNLSK PEDTAVYYCHA SEQ ID NO. 121	GTQDRTRGRNFDH SEQ ID NO. 182	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
097A09	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS	INTMG	WYRQTPGKQREL V	DTTSGGNTYIDAVK	RFTISRDNKNTLYLQMNLSK	EIVVLGVWTRARATGNY	WGQGTQVTVSS
	CVASGSIVR SEQ ID NO. 81.	SEQ ID NO. 143	A SEQ ID NO. 102	G SEQ ID NO. 163	PEDTAVYYCNA SEQ ID NO. 122	SEQ ID NO. 183	SEQ ID NO. 133
159B10	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 82	SLSMG SEQ ID NO. 144	WFRQAPGKERAFV A SEQ ID NO. 103	ALTRNGGYYRYSV KG SEQ ID NO. 164	RFTISRDNKNTLYLQMNLSK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 123	DLSGSDYLGNTLDY SEQ ID NO. 184	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
163D02	EVQLVDSGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 83	DYAMG SEQ ID NO. 145	WFRQAPGKEREV A SEQ ID NO. 104	AITWNGGRVYFVASV KG SEQ ID NO. 165	RFTISRDNKNTLYLQMNLSK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 124	DKDRRTDYLGHFVAY SEQ ID NO. 185	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
163E03	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS CVASGRIFS SEQ ID NO. 84	SNAMG SEQ ID NO. 146	WFRQAPGKEREV A SEQ ID NO. 105	AITWRSGGSAYYADS KG SEQ ID NO. 166	RFTISRDNKNTLYLQMNLSK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 125	GGSSWLSFPDPY SEQ ID NO. 186	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
002B02	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLS CAASGILT SEQ ID NO. 85	INAMG SEQ ID NO. 147	WYRQAPGKQREL V SEQ ID NO. 106	RRTRGSTYYQDSV G SEQ ID NO. 167	RFTISRDNKNTLYLQMNLSK PEDTAVYYCML SEQ ID NO. 126	DDRGGVY SEQ ID NO. 187	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
146A06	EVQLVDSGGGLVQAGGSLRLS CAASGRIQT SEQ ID NO. 86	INAMG SEQ ID NO. 148	WYRQAPGKQREL V SEQ ID NO. 107	VITSGRIRYADSVK G SEQ ID NO. 168	RFTISRDNKNTLYLQMNLSK PEDTAVYYYNV SEQ ID NO. 127	ETVVGAVY SEQ ID NO. 188	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
147A01	EVQLVDSGGGLVQAGGSLRLS CAASGRMN SEQ ID NO. 87	INAMG SEQ ID NO. 149	WYRQAPGKEREV A SEQ ID NO. 108	KITRGGAITYADSVK G SEQ ID NO. 169	RFTIARDNLIANTAYLQMNLSK PEDTAVYYYNV SEQ ID NO. 128	DGSPSONY SEQ ID NO. 189	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
144D01	EVQLVDSGGGLVQAGGSLRLS CAASGTIGT SEQ ID NO. 88	IRAMG SEQ ID NO. 150	WYRQAPGKQREL V SEQ ID NO. 109	LITSTRGRINYADSVK G SEQ ID NO. 170	RFTIARDNLIANTAYLQMNLSK PEDTAVYYINI SEQ ID NO. 129	ETLRRNY SEQ ID NO. 190	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
054B12	EVQLVDSGGGLVQAGGSLRLS CAVSGSFR SEQ ID NO. 89	INTMG SEQ ID NO. 151	WYRRAPGKQREL V SEQ ID NO. 110	ARDRGGYINVDVSK G SEQ ID NO. 171	RFTISRDNKNTLYLQMNLSK PEDTAVYYCHA SEQ ID NO. 130	GTQDRTRGRNFDH SEQ ID NO. 191	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131

21. Оптимизация последовательности - полипептиды-антагонисты CXCR2.

Анализ на тепловой сдвиг (TSA): 5 мкл очищенного одновалентного нанотела (80 мг/мл) смешива-

ли с 5 мкл флуоресцентного зонда Sypro Orange (Invitrogen, Carlsbad, CA, catalogue # S6551) (конечная концентрация 10×) в 10 мкл буфера (100 мМ фосфата, 100 мМ бората, 100 мМ цитрата, 115 мМ NaCl, забуференные при различных pH от 3,5 до 9). Затем образцы нагревали в устройстве LightCycler 480II (Roche, Basel, Switzerland) от 37 до 90°C с приращением 4,4°C/с, после чего эти образцы охлаждали до 37°C с приращением 2,2°C/с. После термоиндуцированного развертывания белков гидрофобные "пэтки" этих белков обрабатывали зондом Sypro Orange, с которым связываются эти белки, что приводило к повышению интенсивности флуоресценции. Точка перегиба первой производной кривой интенсивности флуоресценции соответствовала температуре плавления (T_m). (Ericsson et al. 2006 (Annals of Biochemistry, 357: 289-298).

Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC): эксперименты проводили на оборудовании Auto-Scan VP-DSC (MicroCal - GE Healthcare) в соответствии с инструкциями производителей. Определение температуры плавления нанотел (0,25 мг/мл) осуществляли при скорости нагревания 1°C/мин и при температуре в пределах от 30 до 95°C. Конечные термограммы получали после собственного вычитания фоновых значений. После детектирования пика с помощью компьютерной программы (Origin 7.0) получали соответствующие температуры плавления.

Окисление в условиях стресса: образцы нанотел (1 мг/мл) обрабатывали 10 мМ H₂O₂ в PBS в течение 4 ч при комнатной температуре и в темноте и параллельно обрабатывали контрольные образцы, но в отсутствие H₂O₂, а затем буфер переключали на PBS на обессоливающих центрифужных колонках Zeba (0,5 мл) (Thermo Scientific). Образцы, полученные в условиях стресса, и контрольные образцы анализировали с помощью ОФХ на оборудовании Series 1200 (Agilent Technologies) с колонкой Zorbax 300SB-C3 (Agilent Technologies) при 70°C. Окисление нанотел количественно оценивали путем определения % площади пика от предварительно определенных пиков, образующихся в результате окислительного стресса, по сравнению с главным пиком белка.

Оптимизация последовательности 2B2.

Белковую последовательность родительского 2B2 сопоставляли путем выравнивания последовательности VH3-23 человека (DP-47) и зародышевой линии JH5 (табл. 20, стр. 147). Различия в аминокислотах указанной последовательности по сравнению с последовательностью зародышевой линии человека обозначены буквами, а идентичные аминокислоты показаны точками. Последовательности с подчеркнутыми различиями в аминокислотах отбирали для их превращения в человеческий аналог, а другие последовательности оставались неизменными.

Очищенное одновалентное соединение получали из 2B2, CXCR20059 и CXCR20063, а затем охарактеризовывали в FACS-анализе на лигандное конкурирование и в анализе на индуцированное агонистом высвобождение внутриклеточного кальция (FLIPR) для CXCR2 человека и собакоподобных обезьян. Кроме того, температуру плавления этих вариантов определяли в анализе на тепловой сдвиг (TSA) или с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) (табл. 21). M93L-мутация в CXCR20059 и CXCR20063 элиминирует чувствительность родительского 2B2 к окислению в условиях стресса.

Таблица 21

Функциональная характеристика одновалентного 2B2 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

	T _m (°C)	FACS-анализ на конкурирование с hGro-α, IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
2B2	73,7	1,3×10 ⁻⁰⁹	3,5×10 ⁻⁰⁸	6,5×10 ⁻⁰⁷	2,4×10 ⁻⁰⁵
CXCR20059	73,4	1,5×10 ⁻⁰⁹	1,9×10 ⁻⁰⁸	3,9×10 ⁻⁰⁷	1,9×10 ⁻⁰⁵
CXCR20063	71,9	nd	5,4×10 ⁻⁰⁸	6,1×10 ⁻⁰⁶	2,4×10 ⁻⁰⁵

Оптимизация последовательности 97A9.

Белковую последовательность родительского 97A9 сопоставляли путем выравнивания последовательности человеческого VH3-23 (DP-47) и зародышевой линии JH5 (табл. 22). Различия в аминокислотах указанной последовательности по сравнению с последовательностью зародышевой линии человека обозначены буквами, а идентичные аминокислоты показаны точками. Последовательности с подчеркнутыми различиями в аминокислотах отбирали для их превращения в человеческий аналог, а другие последовательности оставались неизменными.

Очищенное одновалентное соединение получали из 97A9 и CXCR20061, а затем охарактеризовывали в FACS-анализе на лигандное конкурирование и в анализе на индуцированное агонистом высвобождение внутриклеточного кальция (FLIPR) для CXCR2 человека и собакоподобных обезьян. Кроме того, температуру плавления этих вариантов определяли в анализе на тепловой сдвиг (TSA) (табл. 23).

Функциональная характеристика одновалентного 97A9 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

ID	T _m (°C)	FACS-анализ на конкурирование с hGro-α, IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
		hCXCR2 ctrl	cCXCR2 ctrl	hCXCR2	cCXCR2
97A9	76,5	1,2×10 ⁻⁰⁸	6,3×10 ⁻⁰⁸	9,4×10 ⁻⁰⁸	8,0×10 ⁻⁰⁷
CXCR20061	80,2	1,5×10 ⁻⁰⁸	6,2×10 ⁻⁰⁸	6,6×10 ⁻⁰⁸	3,5×10 ⁻⁰⁷

Оптимизация последовательности 163E3.

Белковую последовательность родительского 163E3 сопоставляли путем выравнивания последовательности человеческого VH3-23 (DP-47) и зародышевой линии JH5 (табл. 24). Различия в аминокислотах указанной последовательности по сравнению с последовательностью зародышевой линии человека обозначены буквами, а идентичные аминокислоты показаны точками. Последовательности с подчеркнутыми различиями в аминокислотах отбирали для их превращения в человеческий аналог, а другие последовательности оставались неизменными.

Очищенное одновалентное соединение получали из 163E3 и CXCR20076, а затем охарактеризовывали в FACS-анализе на лигандное конкурирование и в анализе на индуцированное агонистом высвобождение внутриклеточного кальция (FLIPR) для CXCR2 человека и собакоподобных обезьян. Кроме того, температуру плавления этих вариантов определяли в анализе на тепловой сдвиг (TSA) (табл. 25).

Таблица 25

Функциональная характеристика одновалентного 163E3 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

	T _m (°C)	FACS-анализ на конкурирование с hGro-α, IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
163E3	74,4	1,0×10 ⁻⁰⁸	2,2×10 ⁻⁰⁸	3,5×10 ⁻⁰⁸	1,5×10 ⁻⁰⁷
CXCR20076	77,3	1,6×10 ⁻⁰⁸	2,5×10 ⁻⁰⁸	3,1×10 ⁻⁰⁸	1,0×10 ⁻⁰⁷

Оптимизация последовательности 127D1.

Белковую последовательность родительского 127D1 сопоставляли путем выравнивания последовательности человеческого VH3-23 (DP-47) и зародышевой линии JH5 (табл. 26). Различия в аминокислотах указанной последовательности по сравнению с последовательностью зародышевой линии человека обозначены буквами, а идентичные аминокислоты показаны точками. Последовательности с подчеркнутыми различиями в аминокислотах отбирали для их превращения в человеческий аналог, а другие последовательности оставались неизменными.

Очищенное одновалентное соединение получали из 127D1 и CXCR20079, а затем охарактеризовывали в FACS-анализе на лигандное конкурирование и в анализе на индуцированное агонистом высвобождение внутриклеточного кальция (FLIPR) для CXCR2 человека и собакоподобных обезьян. Кроме того, температуру плавления этих вариантов определяли в анализе на тепловой сдвиг (TSA) (табл. 27). M57R-мутация в CXCR20079 элиминирует чувствительность родительского 127D1 к окислению в условиях стресса.

Таблица 27

Функциональная характеристика одновалентного 127D1 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

	T _m (°C)	FACS-анализ на конкурирование с hGro-α, IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
127D1	67,2	5,5×10 ⁻¹⁰	6,1×10 ⁻⁰⁹	1,5×10 ⁻⁰⁸	1,1×10 ⁻⁰⁶
CXCR20079	68,6	8,0×10 ⁻¹⁰	2,8×10 ⁻⁰⁹	1,0×10 ⁻⁰⁸	4,5×10 ⁻⁰⁷

Оптимизация последовательности 163D2.

Белковую последовательность родительского 163D2 сопоставляли путем выравнивания последовательности человеческого VH3-23 (DP-47) и зародышевой линии JH5 (табл. 28). Различия в аминокислотах указанной последовательности по сравнению с последовательностью зародышевой линии человека обозначены буквами, а идентичные аминокислоты показаны точками. Последовательности с подчеркнутыми различиями в аминокислотах отбирали для их превращения в человеческий аналог, а другие последовательности оставались неизменными.

тymi различиями в аминокислотах отбирали для их превращения в человеческий аналог, а другие последовательности оставались неизменными.

Очищенное одновалентное соединение получали из 163D2 и CXCR20086, а затем охарактеризовывали в FACS-анализе на лигандное конкурирование и в анализе на индуцированное агонистом высвобождение внутриклеточного кальция (FLIPR) для CXCR2 человека и собакоподобных обезьян. Кроме того, температуру плавления этих вариантов определяли в анализе на тепловой сдвиг (TSA) (табл. 29).

Таблица 29

Функциональная характеристика одновалентного 163D2 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

	T _m (°C)	FACS-анализ на конкурирование с hGro-α, IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
163D2	70,7	2,8×10 ⁻⁰⁹	7,1×10 ⁻⁰⁹	6,6×10 ⁻⁰⁸	9,2×10 ⁻⁰⁸
CXCR20086	72,3	2,0×10 ⁻⁰⁹	4,8×10 ⁻⁰⁹	7,3×10 ⁻⁰⁸	8,5×10 ⁻⁰⁸

Оптимизация последовательности 54B12. Белковую последовательность родительского 54B12 сопоставляли путем выравнивания последовательности человеческого VH3-23 (DP-47) и зародышевой линии JH5 (табл. 30). Различия в аминокислотах указанной последовательности по сравнению с последовательностью зародышевой линии человека обозначены буквами, а идентичные аминокислоты показаны точками. Последовательности с подчеркнутыми различиями в аминокислотах отбирали для их превращения в человеческий аналог, а другие последовательности оставались неизменными.

Очищенное одновалентное соединение получали из 54B12, CXCR20103 и CXCR2104, а затем охарактеризовывали в FACS-анализе на лигандное конкурирование и в анализе на индуцированное агонистом высвобождение внутриклеточного кальция (FLIPR) для CXCR2 человека и собакоподобных обезьян. Кроме того, температуру плавления этих вариантов определяли в анализе на тепловой сдвиг (TSA) (табл. 31).

Таблица 31

Функциональная характеристика одновалентного 54B12 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

	T _m (°C)	FACS-анализ на конкурирование с hGro-α, IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
		hCXCR2 ctrl	cCXCR2 ctrl	hCXCR2	cCXCR2
54B12	64,4	nf*	3,3×10 ⁻⁰⁸	1,5×10 ⁻⁰⁷	1,1×10 ⁻⁰⁶
CXCR20104	tbd	nf*	1,3×10 ⁻⁰⁸	5,9×10 ⁻⁸	3,5×10 ⁻⁶

Таблица 20

Выравнивание последовательности наноантитела 2B2 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

Kabat#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	101	110
VH3-23/JH5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SSYAMSVVRQAPGKLEWVSAI	SGSGG	STYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYCAK	-----	WGQGLVTVSS			
CXCR22B2V.....E.....	SILTIH..G.Y.....	QR.L.VRRT-R.....T.Q.....A.IA.K.M.....KP.....	MLDDRGGVY.....Q.....				
CXCR20059V.....E.....	SILTIH..G.Y.....	QR.L.VRRT-R.....T.Q.....A.IA.K.M.....KP.....	MLDDRGGVY.....Q.....				
CXCR20063V.....E.....	SILTIH..G.Y.....	QR.L.VRRT-R.....T.Q.....A.IA.K.M.....KP.....	MLDDRGGVY.....Q.....				

VH3-23/JH5 - SEQ ID NO. 212

Таблица 22

Выравнивание последовательности наноантитела 97A9 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

Kabat#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
VH3-23/JH5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SSYAMSVVRQAPGKLEWVSAI	SGSGG	STYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYCAK	-----	WGQGLVTVSS			
CXCR297A9V.....SIVRINT.G.Y.....T.....	QR.L.AD.T.....	NIN.I.A.....T.....	V.....KP.....	NAETVVLGVWVTRARTGNY.....Q.....		
CXCR20061V.....SIVRINT.G.Y.....T.....	QR.L.AD.T.....	NIN.I.A.....T.....	V.....P.....	NAETVVLGVWVTRARTGNY.....Q.....		

Таблица 24

Выравнивание последовательности наноантитела 163E3 и его вариантов
с оптимизированной последовательностью

Kabat#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
VH3-23/JH5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGPTFSYAMSVWRQAPGKLEWVSAISG	SGGSTYYADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAK	-----	WGQGLTVTVSS				
CXCR2163E3V.....V.....R.....N.....G.....F.....ER.....F.....A.....TW.....R.....
CXCR20076R.....L.....N.....G.....F.....ER.....F.....A.....TW.....R.....A.....

Таблица 26

Выравнивание последовательности наноантитела 127D1 и его вариантов
с оптимизированной последовательностью

Kabat#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	101	110
VH3-23/JH5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGPTFSYAMSVWRQAPGKLEWVSAISG	SGGSTYYADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAK	-----	WGQGLTVTVSS				
CXCR2127D1V.....A.....E.....S.....DFK.....V.....G.....Y.....P.....QR.....G.....
CXCR20079S.....DFK.....V.....G.....Y.....P.....QR.....G.....A.....R.....LS.....

Таблица 28

Выравнивание последовательности наноантитела 163D2 и его вариантов
с оптимизированной последовательностью

Kabat#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
VH3-23/JH5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGPTFSYAMSVWRQAPGKLEWVSAISG	SGGSTYYADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAK	-----	WGQGLTVTVSS				
CXCR2163D2V.....A.....T.....V.....S.....R.....D.....G.....F.....ER.....F.....
CXCR20086R.....D.....G.....F.....ER.....F.....A.....TW.....RV.....F.....TA.....

Таблица 30

Выравнивание последовательности наноантитела 54B12 и его вариантов
с оптимизированной последовательностью

Kabat#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
VH3-23/JH5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGPTFSYAMSVWRQAPGKLEWVSAISG	SGGSTYYADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAK	-----	WGQGLTVTVSS				
CXCR254B12V.....A.....T.....V.....S.....R.....D.....G.....F.....ER.....L.....
CXCR20103V.....S.....R.....D.....G.....F.....ER.....L.....A.....RD.....VIN.....
CXCR20104V.....S.....R.....D.....G.....F.....ER.....L.....A.....RD.....VIN.....

Таблица 32

Аминокислотные последовательности вариантов с оптимизированной последовательностью

CXCR20059	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL	VVRRTRGGSTTYQDSVK	SEQ ID NO. 213
	GRFTISADISKNTMYLQMN	SLRPEDTAVYYCLLDDRGGVYWGQGLTVTVSS		
CXCR20063	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL	VVRRTRGGSTTYQDSVK	SEQ ID NO. 214
	GRFTISADISKNTMYLQMN	SLRPEDTAVYYCLLDDRGGVYWGQGLTVTVSS		
CXCR20061	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGSIVRINTMGWYRQAPGKQREL	VADITSGGNINYADSVK	SEQ ID NO. 215
	GRFTISRDNKNTVYLQMN	SLRPEDTAVYYCNAEIVLVGWVWQARTGNVYWGQGLTVTVSS		
CXCR20079	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGSTFDFKVMGWYRQAPGKQREGVAA	IRLSGNRHYAESVK	SEQ ID NO. 216
	GRFTISRANSKNTVYLQMN	SLRPEDTAVYYCKVNIIRGQDYWGQGLTVTVSS		
CXCR20076	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAA	ITWRSGGSAYYADS	SEQ ID NO. 217
	VKGRFTISRDNKNTVYLQMN	SLRPEDTAVYYCAAGSSWLSFPDYWGQGLTVTVSS		
CXCR20086	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAA	ITWNGRVFYTASV	SEQ ID NO. 218
	RGRFTISRDNKNTLYLQMN	SLRPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHFPVAYWGQGLTVTVSS		
CXCR20104	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAVSGSTFRINTMGWYRQAPGKQREL	VAAARDRGGYINYVDSVK	SEQ ID NO. 219
	CRFTISRDNKPTMYLQMN	SLRPEDTAVYYCHAGTQDRTRNFDWRWGQGLTVTVSS		

Таблица 33

Аминокислотные последовательности бипаратопного наноантитела с оптимизированной последовательностью (включая HLE с A1b8)

CXCR20079-35GS-CXCR20076	SEQ ID NO. 221	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDPKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLISGNRHYAESVKGRFTISRANSKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYCKVNIIRGQDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSSAYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTLVTVSS
CXCR20079-35GS-CXCR20086	SEQ ID NO. 222	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDPKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLISGNRHYAESVKGRFTISRANSKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYCKVNIIRGQDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSSAYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTLVTVSS
CXCR20104-35GS-CXCR20076	SEQ ID NO. 223	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSTFRINTMGWYRQAPGKQRELVAAARDRGGYINVDVSKGRFTISRDNKPTMYLQMNLSLRPEDTAVYCKVNIIRGQDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSSAYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTLVTVSS
CXCR20104-35GS-CXCR20086	SEQ ID NO. 224	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSTFRINTMGWYRQAPGKQRELVAAARDRGGYINVDVSKGRFTISRDNKPTMYLQMNLSLRPEDTAVYCKVNIIRGQDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSSAYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTLVTVSS
CXCR20079-35GS-CXCR20076-35GS-A1b8	SEQ ID NO. 225	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDPKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLISGNRHYAESVKGRFTISRANSKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYCKVNIIRGQDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSSAYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGGSDTLVADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYCTIGGSLRSRSGQTLTVTVSS
CXCR20079-35GS-CXCR20061-35GS-A1b8	SEQ ID NO. 226	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDPKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLISGNRHYAESVKGRFTISRANSKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYCKVNIIRGQDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIVRINTMGWYRQAPGKQRELVADITSGGNINADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYCKVNIIRGQDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGGSDTLVADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYCTIGGSLRSRSGQTLTVTVSS
CXCR20079-35GS-CXCR20086-35GS-A1b8	SEQ ID NO. 227	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDPKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLISGNRHYAESVKGRFTISRANSKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYCKVNIIRGQDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSSAYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGGSDTLVADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYCTIGGSLRSRSGQTLTVTVSS
KTTLYLQMNLSLRPEDTAVYCTIGGSLRSRSGQTLTVTVSS		
ALB8	SEQ ID NO. 228	EVQLVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGGSDTLVADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLRPEDTAVYCTIGGSLRSRSGQTLTVTVSS

Таблица 34

Аминокислотные последовательности вариантов с оптимизированной последовательностью и родительских наноантител, включая данные о CDR (Kabat) и каркасных областях

	каркасная область 1	CDR1	каркасная область 2	CDR2	каркасная область 3	CDR3	каркасная область 4
CXCR20059	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGILT SEQ ID NO. 229	INAMG SEQ ID NO. 147	MYRQAPGKQRELVV SEQ ID NO. 106	RRTRGGSTTYQDSVKG SEQ ID NO. 167	RFTISADISKNTMYLQMNLSLR SEQ ID NO. 238	DDRGGVY SEQ ID NO. 187	MQQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
CXCR20063	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGILT SEQ ID NO. 229	INAMG SEQ ID NO. 147	MYRQAPGKQRELVV SEQ ID NO. 106	RRTRGGSTTYQDSVKG SEQ ID NO. 167	RFTISADISKNTMYLQMNLSLR SEQ ID NO. 239	DDRGGVY SEQ ID NO. 187	MQQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
002B02	EVQLVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGILT SEQ ID NO. 85	INAMG SEQ ID NO. 147	MYRQAPGKQRELVV SEQ ID NO. 106	RRTRGGSTTYQDSVKG SEQ ID NO. 167	RFTISADISKNTMYLQMNLSLR SEQ ID NO. 238	DDRGGVY SEQ ID NO. 187	MQQGLTVTVSS SEQ ID NO. 131
CXCR20061	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIVR SEQ ID NO. 230	INTMG SEQ ID NO. 143	MYRQAPGKQRELVV SEQ ID NO. 234	DITSGGNINADSVKGV SEQ ID NO. 235	RFTISRDNKNTVYLQMNLSLR SEQ ID NO. 240	EIVVLVGVWVQARITGNY SEQ ID NO. 183	MQQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
097A09	EVQLVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIVR SEQ ID NO. 81	INTMG SEQ ID NO. 143	MYRQAPGKQRELVV SEQ ID NO. 102	DITSGGNINADSVKGV SEQ ID NO. 163	RFTISRDNKNTVYLQMNLSLR SEQ ID NO. 240	EIVVLVGVWVQARITGNY SEQ ID NO. 183	MQQGLTVTVSS SEQ ID NO. 133
CXCR20079	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFD SEQ ID NO. 231	FKVMG SEQ ID NO. 141	MYRQAPGKQRELVV SEQ ID NO. 235	AIRLISGNRHYAESVKGV SEQ ID NO. 236	RFTISRANSKNTVYLQMNLSLR SEQ ID NO. 241	NIRGQDY SEQ ID NO. 181	MQQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
127D01	EVQLVLESGGGLVQAGSRLRLSCAASGSTFD SEQ ID NO. 79	FKVMG SEQ ID NO. 141	MYRQAPGKQRELVV SEQ ID NO. 100	AIRLISGNRHYAESVKGV SEQ ID NO. 161	RFTISRANSKNTVYLQMNLSLR SEQ ID NO. 120	NIRGQDY SEQ ID NO. 181	MQQGLTVTVSS SEQ ID NO. 131
CXCR20076	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSS SEQ ID NO. 232	SNAMG SEQ ID NO. 146	WFRQAPGKEREFVAAI SEQ ID NO. 105	AITWRSGGSSAYADSVKGV SEQ ID NO. 237	RFTISRDNKNTVYLQMNLSLR SEQ ID NO. 242	GGSSWLSFPPDY SEQ ID NO. 186	MQQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
163E03	EVQLVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSS SEQ ID NO. 84	SNAMG SEQ ID NO. 146	WFRQAPGKEREFVAAI SEQ ID NO. 105	AITWRSGGSSAYADSVKGV SEQ ID NO. 166	RFTISRDNKNTVYLQMNLSLR SEQ ID NO. 125	GGSSWLSFPPDY SEQ ID NO. 186	MQQGLTVTVSS SEQ ID NO. 131
CXCR20086	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSS SEQ ID NO. 233	DYAMG SEQ ID NO. 145	WFRQAPGKEREFVAAI SEQ ID NO. 104	AITWRSGGSSAYADSVKGV SEQ ID NO. 165	RFTISRDNKNTVYLQMNLSLR SEQ ID NO. 243	DKDRRTDYLGHVPVAY SEQ ID NO. 185	MQQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
163D02	EVQLVLESGGGLVQAGSRLRLSCAASGRIFSS SEQ ID NO. 83	DYAMG SEQ ID NO. 145	WFRQAPGKEREFVAAI SEQ ID NO. 104	AITWRSGGSSAYADSVKGV SEQ ID NO. 165	RFTISRDNKNTVYLQMNLSLR SEQ ID NO. 124	DKDRRTDYLGHVPVAY SEQ ID NO. 185	MQQGLTVTVSS SEQ ID NO. 131
CXCR20104	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSTFR SEQ ID NO. 234	INTMG SEQ ID NO. 151	MYRQAPGKQRELVV SEQ ID NO. 234	ARDRGGYINVDVSKGV SEQ ID NO. 171	RFTISRDNKNTVYLQMNLSLR SEQ ID NO. 244	GTQDRTGRNPNR SEQ ID NO. 191	MQQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
054B12	EVQLVLESGGGLVQAGSRLRLSCAVSGSTFR SEQ ID NO. 89	INTMG SEQ ID NO. 151	MYRQAPGKQRELVV SEQ ID NO. 110	ARDRGGYINVDVSKGV SEQ ID NO. 171	RFTISRDNKNTVYLQMNLSLR SEQ ID NO. 130	GTQDRTGRNPNR SEQ ID NO. 191	MQQGLTVTVSS SEQ ID NO. 131

Данные для CDR вариантов с оптимизированной последовательностью по Chotia

	HCDR1	HCDR2	HCDR3
CXCR20059	GSILTIN	TRGGS	DDRGGVY
CXCR20063	GSILTIN	TRGGS	DDRGGVY
CXCR20061	GSIVRIN	TSGGN	EIVVLGVVWTQRARTGNY
CXCR20079	GSTDFDK	RLSGN	NIRGQDY
CXCR20076	GRIFSSN	TWRSGGS	GGSSWLSFPPDY
CXCR20086	GRTFSDY	TWNGGR	DKDRRTDYLGHVPVAY
CXCR20104	GSTFRIN	DRGGY	GTQDRTGRNFDR

22. Картирование эпитопов.

Картирование эпитопов для нанотел осуществляли как описано в публикации Integral Molecular Inc., 3711 Market street, Suite 900, Philadelphia, PA, USA, www.integralmolecular.com с применением технологии мутагенеза методом "дробовика".

Краткое описание технологии мутагенеза по методу "дробовика".

При мутагенезе методом "дробовика" применяется патентованная крупномасштабная технология клеточной экспрессии, которая позволяет осуществлять экспрессию и анализ крупных библиотек мутированных белков-мишеней в эукариотических клетках. Каждый остаток в белке был мутирован отдельно, обычно его заменяли многими другими аминокислотами для анализа изменения функции белка. Белки были экспрессированы в стандартных клеточных линиях млекопитающих так, чтобы можно было картировать белки даже со сложной структурой, трансляция или посттрансляционный процессинг которых должны происходить в эукариотических клетках.

Для картирования эпитопов использовали следующую номенклатуру:

RDHBC 792 = CXCR20079,

RDHBC 793 = CXCR20061,

RDHBC 794 = CXCR20076.

Эпитопы для анти-CXCR2 антител RD-HBC792 (CXCR20079), RD-HBC793 (CXCR20061) и RD-HBC794 (CXCR20076) картировали с разрешением в одну аминокислоту посредством мутагенеза методом "дробовика".

Родительская конструкция: немеченный родительский ген клонировали в вектор с высоким уровнем экспрессии, а затем секвенировали и его экспрессию подтверждали посредством иммунодетектирования. Оптимизация нанотела: детектирование нанотел было оптимизировано в формате мутагенеза методом "дробовика" путем анализа панели разведений нанотел в 394-луночных микропланшетах. Оптимальную концентрацию каждого нанотела отбирали для скрининга библиотеки с мутациями. После конструирования библиотеки с мутациями аминокислоту в каждом положении заменяли консервативным и неконсервативным остатком, включая замену каждого остатка на Ala. Эту библиотеку тестировали на поверхностную экспрессию и скринировали с тремя повторностями на связывание нанотела посредством иммунодетектирования. Затем проводили анализ библиотеки на потерю способности нанотела к связыванию, идентифицировали ключевые остатки и осуществляли картирование.

Экспрессия родительской конструкции: иммунодетектирование временной экспрессии родительской конструкции дикого типа осуществляли в 384-луночном планшете с помощью иммунолюминесцентного и иммунофлуоресцентного анализа. Во всех экспериментах стадии обработки жидкостью включали трансфекцию клеток, а затем проводили иммунологическое окрашивание с использованием роботизированных устройств для обработки жидкостью в целях обеспечения точности результатов и высокой воспроизводимости экспериментов.

Экспериментальные параметры, используемые для анализа родительской плазмиды

Экспериментальные параметры	Иммунолюминесценция	Иммунофлуоресценция
Клетки	HEK-293T	HEK-293T
Фиксация	4% PFA	4% PFA
Блокирующий буфер	10% козья сыворотка	10% козья сыворотка

1 МАb, Мишень Концентрация Инкубирование # по каталогу производителя	Анти-СХСR2 антитело 2 мкг/мл, 1 час, R&D Systems MAB331	Анти-СХСR2 антитело 3 мкг/мл, 1 час, R&D Systems MAB331
2 МАb Мишень Концентрация Производитель # по каталогу	ПХ-конъюгированное антимышинное антитело, 0,8 мкг/мл Jackson Immunoresearch 115-035-003	антимышинное антитело Dyelight 549 3,75 мкг/мл Jackson Immunoresearch 115-505-003
Промывки	PBS++	PBS++
Сигнал:фон	29:1	2,2:1
% коэффициента изменчивости (КИ) конструкции по отношению к родительской конструкции	4,7%	12%

Таблица 37

Экспериментальные параметры, используемые для иммунодетектирования поликлонального антитела

<p>Детектирование общей экспрессии рецептора клеточной поверхности с использованием поликлональной сыворотки. Поликлональную сыворотку (способную реагировать со всеми мутантами) использовали для количественной оценки общей экспрессии в целях детектирования каждого клона в библиотеке с мутациями</p> <p>Экспериментальные параметры</p>	Иммунодетектирование поликлонального антитела
Клетки	HEK-293T
Фиксация	4% PFA
Блокирующий буфер	10% козья сыворотка
1° РАb Мишень Концентрация Инкубирование # по каталогу производителя	Анти-СХСR2 антитело разведение 1:1000 1 час Novus NBP1-49218
2° МАb Мишень Концентрация Производитель # по каталогу	ПХ-конъюгированное антикочичье антитело 0,8 мкг/мл Southern Biotech 4050-05
Промывки	PBS++
Сигнал:фон	17:1
% КИ	10%

Выводы: устойчивую поверхностную экспрессию и общую экспрессию детектировали для родительской конструкция дикого типа с использованием контрольного МАb и поликлональной сыворотки

для того, чтобы такую родительскую конструкцию дикого типа можно было использовать для мутагенеза методом "дробовика". Иммунолюминесцентный анализ дает высокие результаты "сигнал:фон" и низкий коэффициент изменчивости, а поэтому он может быть использован в исследованиях по картированию.

Иммунодетектирование оптимизировали с использованием картируемых нанотел. Иммунодетектирование осуществляли в 384-луночном планшете с использованием клеток, временно трансфицированных только рецептором дикого типа или плазмидным вектором. Концентрации для последующих исследований по картированию были выбраны исходя из значения сигнала, близкого к максимальному, с высоким отношением "сигнал:фон" и с низкой изменчивостью.

Конечные условия проведения скрининг-анализа библиотеки с мутациями.

Таблица 38

Экспериментальные параметры, используемые для оптимизированного анализа посредством детектирования с применением мутагенеза по методу "дробовика" в 384-луночном планшете

Экспериментальные параметры	RD-НВС792	RD-НВС793	RD-НВС794
Клетки	НЕК-293Т	НЕК-293Т	НЕК-293Т
Фиксация	4% PFA	4% PFA	4% PFA
Блокирующий буфер	10% козья сыворотка	10% козья сыворотка	10% козья сыворотка
1° мАб			
Мишень	Анти-СХСR2	Анти-СХСR2	Анти-СХСR2
Оптимальная концентрация	антитело 1,0 мкг/мл	антитело 1,0 мкг/мл	антитело 2,0 мкг/мл
Инкубирование	1 час	1 час	1 час
2° мАб			
Мишень	Анти-тус	Анти-тус	Анти-тус
концентрация	антитело 2 мкг/мл	антитело 2 мкг/мл	антитело 2 мкг/мл
Инкубирование	1 час	1 час	1 час
Производитель	Лаборатория	Лаборатория	Лаборатория
Название антитела	Гибридома 9E10	Гибридома 9E10	Гибридома 9E10
3° мАб			
Мишень	ПХ-конъюгированное антимышиное антитело	ПХ-конъюгированное антимышиное антитело	ПХ-конъюгированное антимышиное антитело
Концентрация	0,8 мкг/мл	0,8 мкг/мл	0,8 мкг/мл
Производитель	Jackson Immunoresearch	Jackson Immunoresearch	Jackson Immunoresearch
# по каталогу	115-035-003	115-035-003	115-035-003
Промывки	PBS++	PBS++	PBS++
Сигнал:фон	13:1	6,9:1	20:1
% КИ	7,9%	22%	13%

Оптимизированные условия анализа, определенные в настоящей заявке, использовали для картирования библиотеки для СХСR2 с мутациями в 384-луночном планшете. Каждый клон библиотеки экспрессировали в клетках путем временной трансфекции и анализировали на реакционную способность нанотела приблизительно через 18 ч после трансфекции. анти-СХСR2 нанотела RD-НВС792, RD-НВС793 и RD-НВС794 не содержали Fc-областей, но содержали тус-метку, а поэтому была применена многостадийная стратегия детектирования, в которой использовали промежуточное мышиное анти-тус-антитело (9E10) с последующим детектированием с использованием ПХ-конъюгированного антимышиного антитела.

Выводы: были определены конечные условия для иммунодетектирования и картирования эпитопов для трех анти-СХСR2 нанотел. Оптимизированные условия давали высокое отношение "сигнал:фон" и низкую изменчивость при мутагенезе, проводимом методом "дробовика", а поэтому они могут быть использованы для картирования эпитопов с высокой достоверностью. Картирование эпитопов включало проведение анализов в тех же самых условиях, определенных выше, но с использованием библиотеки вариантов рецепторов с мутациями.

Идентификация ключевых остатков										
ID остатка	Мутации	ID клона	Поликлональное антитело		RD HBC 792		RD HBC 793		RD HBC 794	
			среднее	ср кв. откл.	среднее	ср кв. откл.	среднее	ср кв. откл.	среднее	ср кв. откл.
11	F11A	10	39.9	17.0	7.1	2.1	81.1	13.7	81.6	20.6
	F11Y	975	70.5	6.2	26.7	14.7	113.9	5.4	100.2	29.1
14	F14A	486	35.4	5.4	8.4	3.9	98.6	8.7	110.3	5.5
	F14Y	1170	100.2	16.7	53.0	10.0	117.7	46.6	124.9	4.6
15	W15A	116	69.2	2.8	8.4	1.4	125.4	18.6	114.5	13.1
	W15Y	1075	92.3	6.2	14.9	6.4	112.2	27.9	110.8	11.4
39	C39A	95	86.2	6.0	65.0	6.7		7.1		0.7
	C39N	1099	108.7	8.8	94.4	34.9		6.7		4.4
112	W112A	318	88.2	12.9	102.8	28.7		7.4		6.6
	W112Y	1462	109.9	13.6	106.1	25.1	37.1	6.2	39.9	16.1
114	F114A	211	88.9	5.8	73.1	10.6		8.4		33.4
	F114Y	1560	122.3	14.6	87.4	21.0	102.2	25.4	116.8	37.2
115	G115A	320	82.7	7.7	70.4	14.1		5.2		2.2
	G115T	1561	82.4	40.6	89.7	9.8	61.7	14.8	55.6	6.6
188	Y188A	765	89.6	21.2	100.0	37.7	102.8	12.4		6.3
	Y188F	1634	133.8	16.2	106.8	14.2	87.1	31.1	107.2	11.7
196	C196A	963	86.9	16.4	99.9	17.2		7.0		2.4
	C196N	1836	97.9	8.1	90.9	14.3		2.1		3.3
274	D274A	889	101.4	14.9	102.2	1.9		7.0		9.2
	D274E	1955	80.3	20.3	97.5	6.6	52.1	13.2	60.4	14.3
282	I282A	669	79.6	10.7	66.8	17.7		12.2		8.8
	I282N	1989	58.8	9.2	78.5	13.7		19.0		3.1
285	T285A	770	64.8	14.3	53.1	2.4		9.7		13.6
	T285S	2215	154.4	65.9	91.8	23.2	116.4	37.0	121.5	27.0
286	C286A	771	87.3	19.6	57.4	9.6		6.5		2.0
	C286N	2024	92.0	20.9	58.0	13.5		9.3		8.2
293	D293A	778	131.5	4.9	100.8	49.9		8.2	44.9	17.6
	D293E	2127	150.3	23.4	138.9	24.6	73.3	26.5	141.9	19.4

Ключевые остатки для MAb идентифицировали путем сравнения реактивности клонов нанотел с реактивностью поликлональных нанотел (поверхностная экспрессия). Остатки, присутствующие в эпитопе для антитела, были идентифицированы как остатки, не связывающиеся с нанотелом, но связывающиеся с поликлональным антителом, включая замену остатком Ala (т.е. удаление боковой цепи остатка), и эти остатки были локализованы во внеклеточных петлях. Были представлены средние значения реактивности и стандартное отклонение для связывания с MAb и для связывания с поликлональным антителом. Ключевые остатки, идентифицированные для каждого MAb, показаны серым цветом. Данные для RD HBC792 также сравнивали с данными для RD HBC793, поскольку было обнаружено, что профиль связывания с RD HBC792 был аналогичен профилю связывания с коммерчески доступной поликлональной сывороткой (которая происходила от N-концевого внеклеточного домена CXCR2 человека, что, вероятно, служит объяснением более низкой реактивности сыворотки, содержащей мутации F11, F14 и W15).

Дополнительный анализ данных об эпитопах.

Ключевые аминокислоты, идентифицированные путем картирования с помощью мутагенеза методом "дробовика", позволяют определить сайт(ы) связывания с тремя анти-CXCR2 MAb. Карты MAb RD HBC792 для N-концевой области CXCR2 и локализация ключевых остатков в непосредственной близости друг от друга позволяют предположить, что этот эпитоп по своей природе является линейным. MAb RD HBC793 и RD HBC794, очевидно, связываются с конформационно сложным эпитопом, образованным, главным образом, ECL1 и ECL3 рецептора CXCR2. Мутация внеклеточных остатков Cys, которые, как известно, образуют два дисульфидных мостика, удерживающих внеклеточные петли в положении хемокиновых рецепторов, также приводит к элиминации связывания MAb 793 и 794, а поэтому, очевидно, что они не принимают непосредственного участия во взаимодействии с эпитопом. Эпитопы для 793 и 794 в значительной степени перекрываются, хотя и имеют незначительные различия.

Варианты осуществления изобретения

1. Полипептид, содержащий по меньшей мере два антигенсвязывающих домена иммуноглобулина, где полипептид направлен против хемокинового рецептора CXCR2 или связывается с этим рецептором, и где указанный полипептид включает первый антигенсвязывающий домен, распознающий первый эпитоп на CXCR2, и второй антигенсвязывающий домен, распознающий второй эпитоп на CXCR2.

2. Полипептид по варианту осуществления 1, где указанный первый антигенсвязывающий домен способен связываться с линейным пептидом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, а указанный второй антигенсвязывающий домен не способен связываться с указанным линейным пептидом, либо связывается с этим пептидом с меньшей аффинностью.

3. Полипептид по варианту осуществления 1 или 2, где указанный первый антигенсвязывающий

домен содержится в одном вариабельном домене первого иммуноглобулина, а указанный второй антигенсвязывающий домен содержится в одном вариабельном домене второго иммуноглобулина.

4. Полипептид по варианту осуществления 3, где по меньшей мере один из указанных первого и второго антигенсвязывающих доменов содержится в V_L -домене антитела или в его фрагменте.

5. Полипептид по варианту осуществления 3, где по меньшей мере один из указанных первого и второго антигенсвязывающих доменов содержится в V_H -домене антитела или в его фрагменте.

6. Полипептид по варианту осуществления 4 или 5, где указанный первый антигенсвязывающий домен содержится в V_L -домене или в его фрагменте, а указанный второй антигенсвязывающий домен содержится в V_H -домене или в его фрагменте.

7. Полипептид по варианту осуществления 4 или 5, где указанный первый антигенсвязывающий домен содержится в V_H -домене или в его фрагменте, а указанный второй антигенсвязывающий домен содержится в V_L -домене или в его фрагменте.

8. Полипептид по любому из вариантов осуществления 3-7, где указанные первый и второй антигенсвязывающие домены содержатся в первом и втором доменных антителах (dAb).

9. Полипептид по варианту осуществления 3 или 5, где по меньшей мере один из указанных первого и второго антигенсвязывающих доменов содержится в V_{HH} -домене или в его фрагменте, происходящем от одной тяжелой цепи антитела с тяжелой цепью, полученного от животного семейства верблюжьих, или в его варианте с оптимизированной последовательностью, включая гуманизированный вариант.

10. Полипептид по варианту осуществления 9, где каждый из указанных антигенсвязывающих доменов содержится в V_{HH} -домене или в его фрагменте, происходящем от одной тяжелой цепи антитела с тяжелой цепью, полученного от животного семейства верблюжьих, или в его варианте с оптимизированной последовательностью, включая гуманизированный вариант.

11. Полипептид по варианту осуществления 9 или 10, где каждая V_{HH} -последовательность или ее фрагмент включают одну, две или три CDR.

12. Полипептид по любому из вариантов осуществления 9-11, где каждая V_{HH} -последовательность имеет структуру FR-CDR-FR-CDR-FR-CDR-FR.

13. Полипептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, где указанные по меньшей мере два антигенсвязывающих домена связаны посредством линкера.

14. Полипептид по любому из вариантов осуществления 3-13, имеющий структуру FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8, где если FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 содержит первый антигенсвязывающий домен, то FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 содержит второй антигенсвязывающий домен, и если FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 содержит второй антигенсвязывающий домен, то FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 содержит первый антигенсвязывающий домен.

15. Полипептид по варианту осуществления 1 или 2, где каждый из указанных первого и второго антигенсвязывающих доменов содержится в антителе с тяжелой цепью.

16. Полипептид по варианту осуществления 1 или 2, где указанный первый антигенсвязывающий домен содержится в одной цепи первого антитела с тяжелой цепью, а указанный второй антигенсвязывающий домен содержится в одной цепи второго антитела с тяжелой цепью, где указанные первое и второе антитело с одной тяжелой цепью связаны посредством линкера.

17. Полипептид по варианту осуществления 1 или 2, где каждый из указанных первого и второго антигенсвязывающих доменов содержится в антителе, состоящем из двух тяжелых цепей и двух легких цепей.

18. Полипептид по варианту осуществления 1 или 2, где указанный первый и второй антигенсвязывающие домены содержатся в первом и втором антителах, соответственно, где каждое из этих антител содержит две тяжелых и две легких цепи, и где указанные первое и второе антитела связаны посредством линкера.

19. Полипептид по варианту осуществления 1 или 2, где указанный первый и второй антигенсвязывающие домены содержатся в первом и втором Fab- или $F(ab)_2$ -фрагментах антитела, соответственно, и где указанные первый и второй Fab- или $F(ab)_2$ -фрагменты связаны посредством линкера.

20. Полипептид по варианту осуществления 19, где указанный первый антигенсвязывающий домен содержится в Fab-фрагменте антитела, а указанный второй антигенсвязывающий домен содержится в $F(ab)_2$ -фрагменте или наоборот.

21. Полипептид по варианту осуществления 1 или 2, где указанный первый и второй антигенсвязывающие домены содержатся в первом и втором одноцепочечных Fv (scFv) антитела или в их фрагментах, соответственно, и где указанные первый и второй scFvs связаны посредством линкера.

22. Полипептид по любому из вариантов осуществления 13, 14, 16, 18, 19, 20 или 21, где линкер соединяет С-конец одного иммуноглобулина, содержащего антигенсвязывающий домен, с N-концом второго иммуноглобулина, содержащего антигенсвязывающий домен.

23. Полипептид по любому из вариантов осуществления 13, 14, 16 или 18-22, где линкером является пептид, содержащий аминокислотную последовательность, не происходящую от иммуноглобулина.

24. Полипептид по варианту осуществления 23, где пептидный линкер имеет длину в 3-50 аминокислотных остатков.

кислот.

25. Полипептид по варианту осуществления 24, где число аминокислот в линкере выбрано из 3-9, 10-15, 16-20, 21-25, 26-35, 36-40, 41-45 или 46-50.

26. Полипептид по варианту осуществления 24, где линкер имеет длину в 35 аминокислот.

27. Полипептид по варианту осуществления 24, где линкер состоит только из двух различных аминокислот.

28. Полипептид по варианту осуществления 27, где линкер состоит из аминокислот глицина и серина.

29. Полипептид по варианту осуществления 27, где линкер состоит из аминокислот пролина и серина, и необязательно, аланина.

30. Полипептид по любому из вариантов осуществления 23-26, где линкер состоит только из аланина.

31. Полипептид по варианту осуществления 27, где пептидный линкер состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 220.

32. Полипептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, где указанный полипептид включает аминокислотные последовательности CDR, происходящие от верблюжьих антител, имеющих одну тяжелую цепь или соответствующие этим антителам.

33. Полипептид по любому из вариантов осуществления 9-14, где аминокислотные последовательности каркасных областей происходят от верблюжьих антител, имеющих одну тяжелую цепь или соответствуют этим антителам.

34. Полипептид по любому из вариантов осуществления 9-14, где аминокислотные последовательности каркасных областей имеют оптимизированную последовательность, включая их гуманизированные варианты.

35. Полипептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, который специфически связывается с CXCR2.

36. Полипептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, который направлен против CXCR2 человека или связывается с ним.

37. Полипептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, включающий по меньшей мере один дополнительный антигенсвязывающий домен, который направлен против сывороточного белка или специфически связывается с сывороточным белком.

38. Полипептид по любому из предшествующих вариантов осуществления, где указанным сывороточным белком является альбумин сыворотки человека.

39. Молекула, которая содержит по меньшей мере два полипептида и которая направлена против хемокинового рецептора CXCR2 или связывается с ним, где первый полипептид содержит первый антигенсвязывающий домен иммуноглобулина, а второй полипептид содержит второй антигенсвязывающий домен иммуноглобулина, где указанные первый и второй антигенсвязывающие домены распознают первый и второй эпитопы на CXCR2, и где указанные по меньшей мере два полипептида связаны посредством непептидного линкера.

40. Молекула как вариант осуществления по варианту осуществления 38, где указанный первый антигенсвязывающий домен обладает способностью связываться с линейным пептидом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, а указанный второй антигенсвязывающий домен либо не связывается с указанным линейным пептидом, либо связывается с этим пептидом с низкой аффинностью.

41. Молекула как вариант осуществления по варианту осуществления 39 или 40, имеющая отличительный признак, определенный по любому из вариантов осуществления 3-22 и 32-38.

42. Полипептид по любому из вариантов осуществления 3-14 или 22-39, где указанный один переменный домен второго иммуноглобулина включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 145, 165 и 185, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 145, 165 или 185, и где указанный один переменный домен первого иммуноглобулина включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 141, 161 и 181, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 141, 161 или 181 (163D2/127D1).

43. Полипептид по варианту осуществления 42, имеющий структуру варианта по варианту осуществления 14, где в указанном одном переменном домене второго иммуноглобулина, CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 185, и где в указанном одном переменном домене первого иммуноглобулина CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181.

44. Полипептид по варианту осуществления 43, где аминокислотные последовательности CDR1,

CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80% идентичны аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 145, 165, 185, 141, 161 или 181.

45. Полипептид по варианту осуществления 43 или 44, где аминокислотные последовательности отличаются от последовательностей SEQ ID NO: 145, 165, 185, 141, 161 или 181 только консервативными аминокислотными заменами.

46. Полипептид по любому из вариантов осуществления 43-45, где каркасные области в каждом мономере одного переменного домена содержат один или несколько ключевых остатков в положениях аминокислот 11, 37, 44, 46, 47, 83, 84, 103, 104 и 108, пронумерованных по Kabat.

47. Полипептид по любому из вариантов осуществления 43-46, где FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83; FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104; FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124; FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131; FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79; FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

48. Полипептид по варианту осуществления 47, модифицированный так, что FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 имеют аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80% идентичны любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 83, 104, 124, 131, 79, 100 или 120.

49. Полипептид по любому из вариантов осуществления 41-48, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58.

50. Полипептид по любому из вариантов осуществления 42-46, где указанный один переменный домен второго иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 218, и где указанный один переменный домен первого иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 216.

51. Полипептид по любому из вариантов осуществления 3-14 или 22-39, где указанный один переменный домен второго иммуноглобулина включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146, 166 и 186, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 146, 166 или 188, и где указанный один переменный домен первого иммуноглобулина включает по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 141, 161 и 181, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 141, 161 или 181 (163E3/127D1).

52. Полипептид по варианту осуществления 51, имеющий структуру варианта по варианту осуществления 14, где в указанном одном переменном домене второго иммуноглобулина CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 166, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186, и где в указанном одном переменном домене первого иммуноглобулина CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181.

53. Полипептид по варианту осуществления 52, где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80% идентичны любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 176, 166, 186, 141, 161 или 181.

54. Полипептид по варианту осуществления 52 или 53, где аминокислотные последовательности отличаются от последовательностей SEQ ID NO: 146, 166, 186, 141, 161 или 181 только консервативными аминокислотными заменами.

55. Полипептид по любому из вариантов осуществления 52-54, где каркасные области в каждом мономере одного переменного домена содержат один или несколько ключевых остатков в положениях аминокислот 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 и 108.

56. Полипептид по любому из вариантов осуществления 52-55, где FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84; FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105; FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125; FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131; FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79; FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

57. Полипептид по варианту осуществления 56, модифицированный так, что FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 имеют аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%

идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 83, 105, 125, 131, 79, 100 или 120.

58. Полипептид по любому из вариантов осуществления 51-57, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 59.

59. Полипептид по любому из вариантов осуществления 51-58, где указанный один переменный домен второго иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 217, и где указанный один переменный домен первого иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 216.

60. Полипептид по любому из вариантов осуществления 3-14 или 22-39, где указанный один переменный домен второго иммуноглобулина включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146, 166 и 186, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 146, 166 или 188, и где указанный один переменный домен первого иммуноглобулина включает по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 151, 171 и 191, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 151, 171 или 191 (163E3/54B12).

61. Полипептид по варианту осуществления 60, имеющий структуру варианта по варианту осуществления 14, где в указанном одном переменном домене второго иммуноглобулина CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 166; а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186, и где в указанном одном переменном домене первого иммуноглобулина CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 171, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191.

62. Полипептид по варианту осуществления 61, где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80% идентичны любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 146, 166, 186, 151, 171 или 191.

63. Полипептид по варианту осуществления 61 или 62, где аминокислотные последовательности отличаются от последовательностей SEQ ID NO: 146, 166, 186, 151, 171 или 191 только консервативными аминокислотными заменами.

64. Полипептид по любому из вариантов осуществления 61-63, где каркасные области в каждом мономере одного переменного домена содержат один или несколько ключевых остатков в положениях аминокислот 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 и 108, пронумерованных по Kabat.

65. Полипептид по любому из вариантов осуществления 61-64, где FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84; FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105; FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125; FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131; FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110; FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

66. Полипептид по варианту осуществления 65, который модифицирован так, что FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 имеют аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 84, 105, 125, 131, 89, 110 или 130.

67. Полипептид по любому из вариантов осуществления 60-66, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 62.

68. Полипептид по любому из вариантов осуществления 60-64, где указанный один переменный домен второго иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 217, и где указанный один переменный домен первого иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 219 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 219.

69. Полипептид по любому из вариантов осуществления 3-14 или 22-39, где указанный один переменный домен второго иммуноглобулина включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 145, 165 и 185, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 145, 165 или 185, и где указанный один переменный домен первого

иммуноглобулина включает по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 151, 171 и 191, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 151, 171 или 191 (163D2/54B12).

70. Полипептид по варианту осуществления 69, имеющий структуру варианта по варианту осуществления 14, где в указанном одном переменном домене второго иммуноглобулина CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 185, и где в указанном одном переменном домене первого иммуноглобулина CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 171, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191.

71. Полипептид по варианту осуществления 70, где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80% идентичны любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 145, 165, 185, 151, 171 или 191.

72. Полипептид по варианту осуществления 70 или 71, где аминокислотные последовательности отличаются от последовательностей SEQ ID NO: 145, 165, 185, 151, 171 или 191 только консервативными аминокислотными заменами.

73. Полипептид по любому из вариантов осуществления 70-72, где каркасные области в каждом мономере одного переменного домена содержат один или несколько ключевых остатков в положениях аминокислот 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 и 108, пронумерованных по Kabat.

74. Полипептид по любому из вариантов осуществления 70-73, где FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83; FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104; FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124; FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131; FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110; FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

75. Полипептид по варианту осуществления 74, который модифицирован так, что FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 имеют аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 83, 104, 124, 131, 89, 110 или 130.

76. Полипептид по любому из вариантов осуществления 69-75, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63.

77. Полипептид по любому из вариантов осуществления 69-73, где указанный один переменный домен второго иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 218, и где указанный один переменный домен первого иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 219 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 219.

78. Полипептид по любому из вариантов осуществления 3-14 или 22-39, где указанный один переменный домен первого иммуноглобулина включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 147, 167 и 187, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 147, 167 или 187, и где указанный один переменный домен второго иммуноглобулина включает по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146, 166 и 186, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 146, 166 или 186 (2B2/163E3).

79. Полипептид по варианту осуществления 78, имеющий структуру варианта по варианту осуществления 14, где в указанном одном переменном домене первого иммуноглобулина CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 167, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 187, и где в указанном одном переменном домене второго иммуноглобулина, CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 166, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186.

80. Полипептид по варианту осуществления 79, где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80% идентичны любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 147, 167, 187, 146, 166 или 186.

81. Полипептид по варианту осуществления 79 или 80, где аминокислотные последовательности отличаются от последовательностей SEQ ID NO: 147, 167, 187, 146, 166 или 186 только консервативными аминокислотными заменами.

82. Полипептид по любому из вариантов осуществления 79-81, где каркасные области в каждом

мономере одного варибельного домена содержат один или несколько ключевых остатков в положениях аминокислот 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 и 108, пронумерованных по Kabat.

83. Полипептид по любому из вариантов осуществления 79-82, где FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106; FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126; FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131; FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84; FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105; FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

84. Полипептид по варианту осуществления 83, который модифицирован так, что FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 имеют аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 85, 106, 126, 131, 84, 105 или 125.

85. Полипептид по любому из вариантов осуществления 78-84, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 64.

86. Полипептид по любому из вариантов осуществления 78-82, где указанный один варибельный домен первого иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213 или 214, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 213 или 214, и где указанный один варибельный домен второго иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 217.

87. Полипептид по любому из вариантов осуществления 3-14 или 22-39, где указанный один варибельный домен первого иммуноглобулина включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 147, 167 и 187 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 147, 167 или 187, и где указанный один варибельный домен второго иммуноглобулина включает по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 145, 165 и 185, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 145, 165 или 185 (2B2/163D2).

88. Полипептид по варианту осуществления 87, имеющий структуру варианта по варианту осуществления 14, где в указанном одном варибельном домене первого иммуноглобулина CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147, CDR2 содержит аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 167, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 187, и где в указанном одном варибельном домене второго иммуноглобулина CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 185.

89. Полипептид по варианту осуществления 88, где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80% идентичны любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 147, 167, 187, 145, 165 или 185.

90. Полипептид по варианту осуществления 88 или 89, где аминокислотные последовательности отличаются от последовательностей SEQ ID NO: 147, 167, 187, 145, 165 или 185 только консервативными аминокислотными заменами.

91. Полипептид по любому из вариантов осуществления 88-90, где каркасные области в каждом мономере одного варибельного домена содержат один или несколько ключевых остатков в положениях аминокислот 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 и 108, пронумерованных по Kabat.

92. Полипептид по любому из вариантов осуществления 88-91, где FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106; FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126; FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131; FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83; FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104; FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

93. Полипептид по варианту осуществления 94, который модифицирован так, что FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 имеют аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 85, 106, 126, 131, 83, 104 или 124.

94. Полипептид по любому из вариантов осуществления 87-93, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65.

95. Полипептид по любому из вариантов осуществления 87-91, где указанный один варибельный

домен первого иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213 или 214 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 213 или 214, и где указанный один переменный домен второго иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 218.

96. Полипептид по любому из вариантов осуществления 3-14 или 22-39, где указанный один переменный домен второго иммуноглобулина включает по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 143, 163 и 183, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 143, 163 или 183, и где указанный один переменный домен первого иммуноглобулина включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 147, 167 и 187, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 147, 167 или 187 (97A9/2B2).

97. Полипептид по варианту осуществления 96, имеющий структуру варианта по варианту осуществления 14, где в указанном одном переменном домене второго иммуноглобулина CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, и где в указанном одном переменном домене первого иммуноглобулина CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 167, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 187.

98. Полипептид по варианту осуществления 97, где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80% идентичны любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 143, 163, 183, 147, 167 или 187.

99. Полипептид по варианту осуществления 97 или 98, где аминокислотные последовательности отличаются от последовательностей SEQ ID NO: 143, 163, 183, 147, 167 или 187 только консервативными аминокислотными заменами.

100. Полипептид по любому из вариантов осуществления 97-99, где каркасные области в каждом мономере одного переменного домена содержат один или несколько ключевых остатков в положениях аминокислот 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 и 108, пронумерованных по Kabat.

101. Полипептид по любому из вариантов осуществления 97-100, где FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81; FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122; FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133; FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106; FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

102. Полипептид по варианту осуществления 101, который модифицирован так, что FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 имеют аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 81, 102, 122, 133, 85, 106, 126 или 131.

103. Полипептид по любому из вариантов осуществления 96-102, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47.

104. Полипептид по любому из вариантов осуществления 96-100, где указанный один переменный домен второго иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 215, и где указанный один переменный домен первого иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213 и 214 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 213 или 214.

105. Полипептид по любому из вариантов осуществления 3-14 или 22-39, где указанный один переменный домен второго иммуноглобулина включает по меньшей мере одну CDR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 143, 163 и 183, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 143, 163 или 183, и где указанный один переменный домен первого иммуноглобулина включает по меньшей мере одну CDR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 151, 171 и 191, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 151, 171 или 191 (97A9/54B12).

106. Полипептид по варианту осуществления 105, имеющий структуру варианта по варианту осуществления 14, где в указанном одном переменном домене второго иммуноглобулина CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143; CDR2 содержит аминокислотную последователь-

ность SEQ ID NO: 163, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, и где в указанном одном переменном домене первого иммуноглобулина CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151; CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 171; а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191.

107. Полипептид по варианту осуществления 106, где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 или CDR6 по меньшей мере на 80% идентичны любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 143, 163, 183, 151, 171 или 191.

108. Полипептид по варианту осуществления 106 или 107, где аминокислотные последовательности отличаются от последовательностей SEQ ID NO: 143, 163, 183, 151, 171 или 191 только консервативными аминокислотными заменами.

109. Полипептид по любому из вариантов осуществления 106-108, где каркасные области в каждом мономере одного переменного домена содержат один или несколько ключевых остатков в положениях аминокислот 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 и 108, пронумерованных по Kabat.

110. Полипептид по любому из вариантов осуществления 106-109, где FR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81; FR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; FR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122; FR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133; FR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; FR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110; FR7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130 и/или FR8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131.

111. Полипептид по варианту осуществления 110, который модифицирован так, что FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 и FR8 имеют аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в любой из SEQ ID NO: 81, 102, 122, 133, 89, 110, 130 или 131.

112. Полипептид по любому из вариантов осуществления 105-111, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, или полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 61.

113. Полипептид по любому из вариантов осуществления 105-109, где указанный один переменный домен второго иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 215, и где указанный один переменный домен первого иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 219 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 219.

114. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-113, содержащий каркасные области с оптимизированной последовательностью, включая частично или полностью гуманизированные каркасные области.

115. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-114, который перекрестно реагирует с CXCR2 приматов, не являющихся человеком.

116. Полипептид по варианту осуществления 115, где указанным приматом является собакоподобная обезьяна.

117. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-116, который не обладает способностью перекрестно реагировать с CXCR2, происходящим от видов, не являющихся приматами.

118. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-117, который не обладает способностью перекрестно реагировать с другими рецепторами хемокинов семейства CXC.

119. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 и 114-118, где указанный второй антигенсвязывающий домен распознает эпитоп CXCR2, содержащий аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 и 12, или находящийся в указанных последовательностях.

120. Полипептид по варианту осуществления 119, где указанный первый антигенсвязывающий домен распознает эпитоп, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или находящийся в указанной последовательности.

121. Полипептид по варианту осуществления 119 или 120, где указанный первый антигенсвязывающий домен распознает эпитоп, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или находящийся в указанной последовательности.

122. Полипептид по любому из вариантов осуществления 119-121, где указанный второй антигенсвязывающий домен распознает эпитоп, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5 или 6 или находящийся в указанных последовательностях.

123. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-122, который может специфически связываться с CXCR2 человека с константой диссоциации (K_D), составляющей 10^{-5} - 10^{-12} моль/л или менее, предпочтительно 10^{-7} - 10^{-12} моль/л или менее, более предпочтительно 10^{-8} - 10^{-12} моль/л.

124. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-123, который может специ-

фически связываться с CXCR2 человека с константой скорости ассоциации k_{on} , составляющей от $10^2 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ и приблизительно до $10^7 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$; предпочтительно от 10^3 до $10^7 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$; более предпочтительно от 10^4 до $10^7 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$; а именно от 10^5 до $10^7 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$.

125. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-124, который может специфически связываться с CXCR2 человека с константой скорости диссоциации k_{off} , составляющей от 1 c^{-1} до 10^{-6} c^{-1} , предпочтительно от 10^{-2} до 10^{-6} c^{-1} , более предпочтительно от 10^{-3} до 10^{-6} c^{-1} , а именно 10^{-4} до 10^{-6} c^{-1} .

126. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-125, который может специфически связываться с CXCR2 человека с аффинностью менее чем 500 нМ, предпочтительно менее чем 200 нМ, более предпочтительно менее чем 10 нМ, например менее чем 500 пМ.

127. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-126, который может ингибировать связывание GRO- α с CXCR2 человека с IC_{50} менее чем 20 нМ.

128. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-127, который может ингибировать GRO- α -индуцированное высвобождение кальция из эритроцитов (RBL), экспрессирующих CXCR2 человека IC_{50} менее чем 100 нМ.

129. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-128, который может ингибировать GRO- α -индуцированную аккумуляцию [^{35}S]GTP γ S в CXCR2-содержащих мембранах СНО человека с IC_{50} менее чем 50 нМ.

130. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-129, где указанный полипептид присутствует, в основном, в выделенной форме.

131. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-130, который представляет собой мультипаратопную конструкцию.

132. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-131, который был модифицирован так, чтобы он имел увеличенное время полужизни *in vivo* по сравнению с временем полужизни соответствующей немодифицированной аминокислотной последовательности.

133. Полипептид по варианту осуществления 132, где указанное увеличенное время полужизни сообщается одной или несколькими связывающимися единицами, выбранными из группы, состоящей из сывороточных белков или их фрагментов; связывающихся единиц, которые могут связываться с сывороточными белками; Fc-части и небольших белков или пептидов, которые могут связываться с сывороточными белками.

134. Полипептид по варианту осуществления 133, где указанные одна или несколько других связывающихся единиц, которые сообщают полипептиду увеличенное время полужизни, выбраны из группы, состоящей из альбумина сыворотки человека или его фрагментов.

135. Полипептид по варианту осуществления 133, где указанные одна или несколько других связывающихся единиц, которые сообщают полипептиду увеличенное время полужизни, выбраны из группы, состоящей из связывающихся единиц, которые могут связываться с сывороточным альбумином (таким как альбумин сыворотки человека) или с сывороточным иммуноглобулином (таким как IgG).

136. Полипептид по варианту осуществления 132, где указанное увеличенное время полужизни сообщается одной или несколькими другими связывающимися единицами, выбранными из группы, состоящей из доменных антител, аминокислотных последовательностей, которые могут быть использованы в качестве доменного антитела; однодоменных антител; аминокислотных последовательностей, которые могут быть использованы в качестве однодоменного антитела; "dAb", аминокислотных последовательностей, которые могут быть использованы в качестве dAb, или нанотел, которые могут связываться с сывороточным альбумином (таким как альбумин сыворотки человека) или с сывороточным иммуноглобулином (таким как IgG).

137. Полипептид по варианту осуществления 134, где указанным полипептидом является один вариабельный домен иммуноглобулина, который может связываться с сывороточным альбумином (таким как альбумин сыворотки человека) или с сывороточным иммуноглобулином (таким как IgG).

138. Полипептид по любому из вариантов осуществления 132-137, имеющий время полужизни в сыворотке, которое по меньшей мере в 1,5 раза, предпочтительно по меньшей мере в 2 раза, а именно по меньшей мере в 5 раз, например по меньшей мере в 10 раз или более чем в 20 раз превышает время полужизни соответствующего немодифицированного полипептида.

139. Полипептид по любому из вариантов осуществления 132-138, имеющий время полужизни в сыворотке, которое более чем на 1 ч, предпочтительно более чем на 2 ч, более предпочтительно более чем на 6 ч, а именно более чем на 12 ч или даже более чем на 24, 48 или 72 ч превышает время полужизни соответствующего немодифицированного полипептида.

140. Полипептид по любому из вариантов осуществления 132-139, имеющий время полужизни в сыворотке человека, составляющее по меньшей мере приблизительно 12 ч, предпочтительно по меньшей мере 24 ч, более предпочтительно по меньшей мере 48 ч, еще более предпочтительно по меньшей мере 72 ч или более, например, по меньшей мере 5 дней (а именно, приблизительно 5-10 дней), предпочтительно по меньшей мере 9 дней (а именно, приблизительно 9-14 дней), более предпочтительно по мень-

шей мере приблизительно 10 дней (а именно, приблизительно 10-15 дней), или по меньшей мере приблизительно 11 дней (а именно, приблизительно 11-16 дней), более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 12 дней (а именно, приблизительно 12-18 дней или более), или более чем 14 дней (а именно, приблизительно 14-19 дней).

141. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-140, который является ПЭГилированным.

142. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-140, который является ПАСилированным.

143. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-140, который является ГЭЖилированным.

144. Полипептид по любому из вариантов осуществления 36 или 37 или по любому из вариантов осуществления 42-143, где указанный дополнительный антигенсвязывающий домен связывается с сывороточным белком с аффинностью менее чем 500 нМ, предпочтительно менее чем 200 нМ, более предпочтительно менее чем 10 нМ, например менее чем 50 нМ.

145. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-144.

146. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая один вариабельный домен иммуноглобулина, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 25-43, 90 и 213-219.

147. Молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 146, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 192-211.

148. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 44-69.

149. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты как вариант по любому из вариантов осуществления 145-148.

150. Клетка-хозяин, способная экспрессировать полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-149, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 145-148.

151. Одновалентное, двухвалентное, мультивалентное, бипаратопное или мультипаратропное нанотело, полученное путем культивирования клетки-хозяина по варианту осуществления 150.

152. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-144 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

153. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-144, используемый в качестве лекарственного средства.

154. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-144, используемый для лечения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и осложнений ХОБЛ.

155. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-144, используемый для лечения кистозного фиброза, астмы, астмы в тяжелой форме, обострений астмы, аллергической астмы, острого поражения легких, острого респираторного дистресс-синдрома, идиопатического фиброза легких, ремоделирования дыхательных путей, синдрома облитерирующего бронхоолита или бронхопальмонарной дисплазии.

156. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-144, используемый для лечения атеросклероза, гломерулонефрита, воспалительного заболевания кишечника (болезни Крона), ангиогенеза и заболеваний, характеризующихся образованием новых кровеносных сосудов, включая дегенерацию желтого пятна, диабетическую ретинопатию и диабетическую невропатию, рассеянный склероз, псориаз, возрастную дегенерацию желтого пятна, глазную болезнь Бехчета, увеит, легочную артериальную гипертензию (ЛАГ), включая идиопатическую ЛАГ, наследственную ЛАГ и заболевание, связанное с ЛАГ; хронические воспалительные заболевания, ревматоидный артрит, остеоартрит, немелкоклеточную карциному, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак пищевода, рак яичника, рак молочной железы, солидные опухоли и их метастазы, меланому, гепатоцеллюлярную карциному или ишемическое реперфузионное повреждение.

157. Способ лечения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) или осложнений ХОБЛ, где указанный способ включает введение индивидууму эффективного количества полипептида по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-144.

158. Способ лечения состояния, выбранного из группы, состоящей из кистозного фиброза, астмы, астмы в тяжелой форме, обострений астмы, аллергической астмы, острого поражения легких, острого респираторного дистресс-синдрома, идиопатического фиброза легких, ремоделирования дыхательных путей, синдрома облитерирующего бронхоолита или бронхопальмонарной дисплазии, где указанный способ включает введение индивидууму эффективного количества полипептида по любому из вариантов осуществления 1-38 или 41-143.

159. Способ лечения состояния, выбранного из группы, состоящей из атеросклероза, гломерулонефрита, воспалительного заболевания кишечника (болезни Крона), ангиогенеза и заболеваний, характеризующихся образованием новых кровеносных сосудов, включая дегенерацию желтого пятна, диабетическую ретинопатию и диабетическую невропатию, рассеянный склероз, псориаз, возрастную дегенерацию желтого пятна, глазную болезнь Бехчета, увеит, легочную артериальную гипертензию (ЛАГ), включая идиопатическую ЛАГ, наследственную ЛАГ и заболевание, связанное с ЛАГ; хронические воспалительные заболевания, ревматоидный артрит, остеоартрит, немелкоклеточную карциному, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак пищевода, рак яичника, рак молочной железы, солидные опухоли и их метастазы, меланому, гепатоцеллюлярную карциному и ишемическое реперфузионное повреждение, где указанный способ включает введение индивидууму эффективного количества полипептида по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-144.

160. Применение полипептида по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-144 для получения лекарственного препарата для лечения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) или осложнений ХОБЛ.

161. Применение полипептида по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-144 для получения лекарственного препарата для лечения астмы, астмы в тяжелой форме, обострений астмы, аллергической астмы, острого поражения легких, острого респираторного дистресс-синдрома, идиопатического фиброза легких, ремоделирования дыхательных путей, синдрома облитерирующего бронхолита или бронхопальмонарной дисплазии.

162. Применение полипептида по любому из вариантов осуществления 1-38 или 42-144 для получения лекарственного препарата для лечения атеросклероза, гломерулонефрита, воспалительного заболевания кишечника (болезни Крона), ангиогенеза и заболеваний, характеризующихся образованием новых кровеносных сосудов, включая дегенерацию желтого пятна, диабетическую ретинопатию и диабетическую невропатию, рассеянный склероз, псориаз, возрастную дегенерацию желтого пятна, глазную болезнь Бехчета, увеит, легочную артериальную гипертензию (ЛАГ), включая идиопатическую ЛАГ, наследственную ЛАГ и заболевание, связанное с ЛАГ; хронические воспалительные заболевания, ревматоидный артрит, остеоартрит, немелкоклеточную карциному, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак пищевода, рак яичника, рак молочной железы, солидные опухоли и их метастазы, меланому, гепатоцеллюлярную карциному или ишемическое реперфузионное повреждение.

163. Полипептид по любому из вариантов осуществления 1-38, который обладает способностью перекрестно блокировать связывание CXCR2 с полипептидом по любому из вариантов осуществления 49, 58, 67, 76, 85, 94, 103 или 112.

164. Молекула по любому из вариантов осуществления 39-41, где указанные первый и второй антигенсвязывающие домены имеют любой из отличительных признаков, характерных для указанных доменов по любому из вариантов осуществления 1-22, 32-38 или 42-144.

165. Молекула по варианту осуществления 164, обладающая любым из отличительных признаков по вариантам осуществления 106-135.

166. Полипептид, содержащий по меньшей мере один вариабельный домен одного иммуноглобулина, который направлен непосредственно против CXCR2 или связывается с CXCR2, и который обладает способностью перекрестно блокировать связывание CXCR2 с полипептидом по любому из вариантов осуществления 49, 58, 67, 76, 85, 94, 103 или 112.

167. Полипептид по вариантам осуществления 3-14 и 22-39, имеющий такую же структуру, как и вариант по варианту осуществления 14, где указанный один вариабельный домен второго иммуноглобулина содержит аминокислотные последовательности CDR, пронумерованные по Kabat и кодируемые депонированной плазмидой DSM 23727, и где указанный один вариабельный домен первого иммуноглобулина содержит аминокислотные последовательности CDR, пронумерованные по Kabat и кодируемые депонированной плазмидой DSM 23726.

168. Полипептид по варианту осуществления 167, который в указанном одном вариабельном домене второго иммуноглобулина также содержит области FR с аминокислотными последовательностями, пронумерованными по Kabat и кодируемыми депонированной плазмидой DSM 23727, и который в указанном одном вариабельном домене первого иммуноглобулина содержит области FR с аминокислотными последовательностями, пронумерованными по Kabat и кодируемыми депонированной плазмидой DSM 23726.

169. Полипептид по варианту осуществления 168, где указанный один вариабельный домен второго иммуноглобулина связан с указанным одним вариабельным доменом первого иммуноглобулина посредством пептидного линкера с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 220.

170. Полипептид по вариантам осуществления 3-14 и 22-39, имеющий такую же структуру, как и вариант по варианту осуществления 14, где указанный один вариабельный домен второго иммуноглобулина содержит аминокислотные последовательности CDR, пронумерованные по Kabat и кодируемые депонированной плазмидой DSM 23725, и где указанный один вариабельный домен первого иммуноглобулина содержит аминокислотные последовательности CDR, пронумерованные по Kabat и кодируемые депонированной плазмидой DSM 23726.

пронумерованными по Kabat и кодируемыми депонированной плазмидой DSM 23723, и который в указанном одном переменном домене второго иммуноглобулина содержит области FR с аминокислотными последовательностями, пронумерованными по Kabat и кодируемыми депонированной плазмидой DSM 23727.

184. Полипептид по варианту осуществления 183, где указанный один переменный домен второго иммуноглобулина связан с указанным одним переменным доменом первого иммуноглобулина посредством пептидного линкера с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 220.

185. Полипептид по вариантам осуществления 3-14 и 22-39, имеющий такую же структуру, как и вариант по варианту осуществления 14, где указанный один переменный домен второго иммуноглобулина содержит аминокислотные последовательности CDR, пронумерованные по Kabat, и кодируемые депонированной плазмидой DSM 23724, и где указанный один переменный домен первого иммуноглобулина содержит аминокислотные последовательности CDR, пронумерованные по Kabat и кодируемые депонированной плазмидой DSM 23723.

186. Полипептид по варианту осуществления 185, который в одном переменном домене второго иммуноглобулина также содержит области FR с аминокислотными последовательностями, пронумерованными по Kabat и кодируемыми депонированной плазмидой DSM 23724, и который в указанном одном переменном домене первого иммуноглобулина содержит области FR с аминокислотными последовательностями, пронумерованными по Kabat и кодируемыми депонированной плазмидой DSM 23723.

187. Полипептид по варианту осуществления 186, где указанный один переменный домен второго иммуноглобулина связан с указанным одним переменным доменом первого иммуноглобулина посредством пептидного линкера с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 220.

188. Полипептид по вариантам осуществления 3-14 и 22-39, имеющий такую же структуру, как и вариант по варианту осуществления 14, где указанный один переменный домен второго иммуноглобулина содержит аминокислотные последовательности CDR, пронумерованные по Kabat и кодируемые депонированной плазмидой DSM 23724, и где указанный один переменный домен первого иммуноглобулина содержит аминокислотные последовательности CDR, пронумерованные по Kabat и кодируемые депонированной плазмидой DSM 23728.

189. Полипептид по варианту осуществления 188, который в одном переменном домене второго иммуноглобулина также содержит области FR с аминокислотными последовательностями, пронумерованными по Kabat и кодируемыми депонированной плазмидой DSM 23724, и который в указанном одном переменном домене первого иммуноглобулина содержит области FR с аминокислотными последовательностями, пронумерованными по Kabat и кодируемыми депонированной плазмидой DSM 23728.

190. Полипептид по варианту осуществления 189, где один переменный домен второго иммуноглобулина связан с указанным одним переменным доменом первого иммуноглобулина посредством пептидного линкера с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 220.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> НОВАРТИС АГ
 <120> СХСР2-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ПОЛИПЕПТИДЫ
 <130> PAT054087
 <160> 248
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 360
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Met Glu Asp Phe Asn Met Glu Ser Asp Ser Phe Glu Asp Phe Trp Lys
 1 5 10 15
 Gly Glu Asp Leu Ser Asn Tyr Ser Tyr Ser Ser Thr Leu Pro Pro Phe
 20 25 30
 Leu Leu Asp Ala Ala Pro Cys Glu Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys
 35 40 45
 Tyr Phe Val Val Ile Ile Tyr Ala Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Leu
 50 55 60
 Gly Asn Ser Leu Val Met Leu Val Ile Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg
 65 70 75 80
 Ser Val Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu
 85 90 95
 Phe Ala Leu Thr Leu Pro Ile Trp Ala Ala Ser Lys Val Asn Gly Trp
 100 105 110
 Ile Phe Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu Lys Glu Val
 115 120 125
 Asn Phe Tyr Ser Gly Ile Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ser Val Asp Arg
 130 135 140
 Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg Tyr
 145 150 155 160
 Leu Val Lys Phe Ile Cys Leu Ser Ile Trp Gly Leu Ser Leu Leu Leu
 165 170 175
 Ala Leu Pro Val Leu Leu Phe Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val
 180 185 190
 Ser Pro Ala Cys Tyr Glu Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Asn Trp Arg
 195 200 205
 Met Leu Leu Arg Ile Leu Pro Gln Ser Phe Gly Phe Ile Val Pro Leu
 210 215 220
 Leu Ile Met Leu Phe Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys
 225 230 235 240
 Ala His Met Gly Gln Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala Val
 245 250 255
 Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Asn Leu Val Leu Leu
 260 265 270
 Ala Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg
 275 280 285
 Arg Asn His Ile Asp Arg Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Leu His Ser Cys Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys
 305 310 315 320
 Phe Arg His Gly Leu Leu Lys Ile Leu Ala Ile His Gly Leu Ile Ser
 325 330 335
 Lys Asp Ser Leu Pro Lys Asp Ser Arg Pro Ser Phe Val Gly Ser Ser
 340 345 350
 Ser Gly His Thr Ser Thr Thr Leu
 355 360
 <210> 2
 <211> 344
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

037063

Met Glu Asp Leu Ser Asn Tyr Ser Tyr Ser Ser Thr Leu Pro Pro Phe
1 5 10 15

Leu Leu Asp Ala Ala Pro Cys Glu Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys
20 25 30

Tyr Phe Val Val Ile Ile Tyr Ala Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Leu
35 40 45

Gly Asn Ser Leu Val Met Leu Val Ile Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg
50 55 60

Ser Val Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu
65 70 75 80

Phe Ala Leu Thr Leu Pro Ile Trp Ala Ala Ser Lys Val Asn Gly Trp
85 90 95

Ile Phe Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu Lys Glu Val
100 105 110

Asn Phe Tyr Ser Gly Ile Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ser Val Asp Arg
115 120 125

Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg Tyr
130 135 140

Leu Val Lys Phe Ile Cys Leu Ser Ile Trp Gly Leu Ser Leu Leu Leu
145 150 155 160

Ala Leu Pro Val Leu Leu Phe Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val
165 170 175

Ser Pro Ala Cys Tyr Glu Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Asn Trp Arg
180 185 190

Met Leu Leu Arg Ile Leu Pro Gln Ser Phe Gly Phe Ile Val Pro Leu
195 200 205

Leu Ile Met Leu Phe Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys
210 215 220

Ala His Met Gly Gln Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala Val
225 230 235 240

Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Asn Leu Val Leu Leu
245 250 255

Ala Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg
260 265 270

Arg Asn His Ile Asp Arg Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Ile
275 280 285

Leu His Ser Cys Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys
290 295 300

Phe Arg His Gly Leu Leu Lys Ile Leu Ala Ile His Gly Leu Ile Ser
305 310 315 320

Lys Asp Ser Leu Pro Lys Asp Ser Arg Pro Ser Phe Val Gly Ser Ser
325 330 335

Ser Gly His Thr Ser Thr Thr Leu
340

<210> 3
<211> 355
<212> Белок
<213> *Macaca fascicularis*

<400> 3

Met Gln Ser Phe Asn Phe Glu Asp Phe Trp Glu Asn Glu Asp Phe Ser
1 5 10 15

Asn Tyr Ser Tyr Ser Ser Asp Leu Pro Pro Ser Leu Pro Asp Val Ala
20 25 30

Pro Cys Arg Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys Tyr Phe Val Val Ile
35 40 45

Ile Tyr Ala Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Leu Gly Asn Ser Leu Val
50 55 60

Met Leu Val Ile Leu His Ser Arg Val Gly Arg Ser Ile Thr Asp Val
65 70 75 80

Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Met Ala Asp Leu Leu Phe Ala Leu Thr Leu
85 90 95

037063

Pro Ile Trp Ala Ala Lys Val Asn Gly Trp Ile Phe Gly Thr Phe
 100 105 110
 Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu Lys Glu Val Asn Phe Tyr Ser Gly
 115 120 125
 Ile Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val
 130 135 140
 His Ala Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg Tyr Leu Val Lys Phe Val
 145 150 155 160
 Cys Leu Ser Ile Trp Ser Leu Ser Leu Leu Leu Ala Leu Pro Val Leu
 165 170 175
 Leu Phe Arg Arg Thr Val Tyr Leu Thr Tyr Ile Ser Pro Val Cys Tyr
 180 185 190
 Glu Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Lys Trp Arg Met Val Leu Arg Ile
 195 200 205
 Leu Pro Gln Thr Phe Gly Phe Ile Leu Pro Leu Leu Ile Met Leu Phe
 210 215 220
 Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys Ala His Met Gly Gln
 225 230 235 240
 Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala Val Val Leu Ile Phe Leu
 245 250 255
 Leu Cys Trp Leu Pro Tyr His Leu Val Leu Leu Ala Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Arg Thr Arg Leu Ile Asn Glu Thr Cys Gln Arg Arg Asn Asn Ile Asp
 275 280 285
 Gln Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Ile Leu His Ser Cys Leu
 290 295 300
 Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys Phe Arg His Gly Leu
 305 310 315 320
 Leu Lys Ile Leu Ala Thr His Gly Leu Ile Ser Lys Asp Ser Leu Pro
 325 330 335
 Lys Asp Ser Arg Pro Ser Phe Val Gly Ser Ser Ser Gly His Thr Ser
 340 345 350
 Thr Thr Leu
 355
 <210> 4
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> *Macaca fascicularis*
 <400> 4
 Met Gln Ser Phe Asn Phe Glu Asp Phe Trp Glu Asn Glu Asp
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 18
 <212> Белок
 <213> *Macaca fascicularis*
 <400> 5
 Cys Thr Leu Met Arg Thr Arg Leu Ile Asn Glu Thr Leu Gln Arg Arg
 1 5 10 15
 Asn Cys
 <210> 6
 <211> 26
 <212> Белок
 <213> *Macaca fascicularis*
 <400> 6
 Cys Arg Arg Thr Val Tyr Leu Thr Tyr Ile Ser Pro Val Leu Tyr Glu
 1 5 10 15
 Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Leu Trp Cys
 20 25
 <210> 7
 <211> 19
 <212> Белок
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7
 Met Glu Asp Phe Asn Met Glu Ser Asp Ser Phe Glu Asp Phe Trp Lys
 1 5 10 15

Gly Glu Asp

<210> 8
 <211> 31
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Glu Asp Leu Ser Asn Tyr Ser Tyr Ser Ser Thr Leu Pro Pro Phe Leu
 1 5 10 15

Leu Asp Ala Ala Pro Cys Glu Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys
 20 25 30

<210> 9
 <211> 26
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Phe Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val Ser Pro Ala Cys Tyr Glu
 1 5 10 15

Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Asn Trp Arg
 20 25

<210> 10
 <211> 26
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Cys Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val Ser Pro Ala Leu Tyr Glu
 1 5 10 15

Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Asn Trp Cys
 20 25

<210> 11
 <211> 18
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg Arg
 1 5 10 15

Asn His

<210> 12
 <211> 18
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Cys Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Leu Glu Arg Arg
 1 5 10 15

Asn Cys

<210> 13
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220> Праймер
 <223> Праймер

<400> 13
 ggctgagctg ggtggctctg g 21

<210> 14
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220> Праймер
 <223> Праймер

<400> 14
 ggctgagttt ggtggctctg g 21

<210> 15
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220> Праймер
 <223> Праймер

<400> 15
 ggtacgtgct gttgaactgt tcc 23

<210> 16
 <211> 55
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

```

<220>
<223> Праймер
<400> 16
catttgagtt ggcctagccg gccatggcag aggtgcagct ggtggagtct ggggg 55

<210> 17
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Праймер
<400> 17
tgtaaaасga cggccagt 18

<210> 18
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Праймер
<400> 18
caggaаасag ctatgacc 18

<210> 19
<211> 88
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Праймер
<400> 19
tcagtaасct ggatcccccg caccgctgc cccaccgcc gctaccoccg caccgctgc 60
ccccaccgcc tgaggagacg gtgacctg 88

<210> 20
<211> 84
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Праймер
<400> 20
aggttactga ggatccggcg gtgagggcag cggaggtggg ggctctggtg gcggggtag 60
cgaggtgcag ctggtgagtc ctgg 84

<210> 21
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Праймер
<400> 21
gaggtgсаат tggtgagtc tggg 24

<210> 22
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Праймер
<400> 22
tgaggagacg gtgacctggg tccc 24

<210> 23
<211> 34
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Праймер
<400> 23
tcctggatcc gagtgсagc tggtgagtc tggg 34

<210> 24
<211> 33
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Праймер
<400> 24
accgcctccg gaggagaccg tgacctgggt ccc 33

<210> 25
<211> 119
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> моновалентные нанотела против CXCR2
<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

```

037063

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asn Lys Asn Thr Leu 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 Thr Val Arg Gly Thr Ala Arg Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 26
 <211> 123
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> моновалентные нанотела против CXCR2

<400> 26

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Leu Ser Gly Arg Ile Gly Ser Ile Asn
 20 25 30

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

Ala Val Ser Arg Ser Gly Gly Ser Thr Asp Ile Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Ala His Thr Ser Ser Tyr Ser Asn Trp Arg Val Tyr Asn Asn Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 27
 <211> 116
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> моновалентные нанотела против CXCR2

<400> 27

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

Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Gly Thr Ile Asn
 20 25 30

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

Ala Val Ile Thr Ser Gly Arg Ile Asp Tyr Ala 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 Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Tyr Asn
 85 90 95

Val Glu Thr Val Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 28
 <211> 116
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

037063

<223> моновалентные нанотела против CXCR2
 <400> 28
 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 Met Gly Asn Ile Asn
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Lys Ile Thr Arg Gly Gly Ala Ile Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ala Arg Asp Asn Ile Leu Asn Thr Ala Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Tyr Asn
 85 90 95
 Val Asp Gly Gly Pro Ser Gln Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 29
 <211> 126
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> моновалентные нанотела против CXCR2
 <400> 29
 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 Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
 35 40 45
 Ser Cys Ile Ser Gly 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 Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Tyr Trp Gly Leu Thr Leu Arg Leu Trp Met Pro Pro His Arg
 100 105 110
 Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 30
 <211> 111
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> моновалентные нанотела против CXCR2
 <400> 30
 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 Gly Leu Ile Phe Arg Leu Ser
 20 25 30
 Gly Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gln Arg Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Leu Thr Lys Asp Gly Thr Leu His Tyr Ala Asp Pro Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Glu Asn Thr Trp Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95
 Thr Gly Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 <210> 31
 <211> 115
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

037063

<220>
 <223> моновалентные нанотела против CXCR2
 <400> 31
 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 Thr Ile Gly Thr Ile Arg
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Leu Ile Thr Ser Thr Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Gly Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Tyr Asn
 85 90 95
 Ile Glu Thr Leu Arg Arg Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115
 <210> 32
 <211> 118
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> моновалентные нанотела против CXCR2
 <400> 32
 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 Thr Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Asn Lys Ser Gly Gly Asn Thr His Tyr Ala Gly 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 Arg Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ser Arg Thr Asn Pro Lys Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Gln Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 33
 <211> 122
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> моновалентные нанотела против CXCR2
 <400> 33
 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 Arg Ser
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Ser Trp Gly Gly Asp Asn 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 Ser
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Gln Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Arg Tyr Arg Gly Gly Ala Ala Val Ala Gly Trp Glu Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

037063

<210> 34
 <211> 124
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> моновалентные нанотела против CXCR2
 <400> 34
 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 Thr Leu Ala Tyr Tyr
 20 25 30
 Thr Val Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Ile
 35 40 45
 Ser Cys Ile Ser Ser Ser Asp Gly 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 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Asp Arg Arg Thr Asp Cys Lys Lys Gly Arg Val Gly Ser Gly
 100 105 110
 Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 35
 <211> 125
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> моновалентные нанотела против CXCR2
 <400> 35
 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 Gly Arg Ala Phe Asn Tyr Tyr
 20 25 30
 Val Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Ser Thr Arg Gly Ser Met Thr Lys Tyr Ser Asp Ser Val
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu His Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Asp Pro Arg Gly Ser Ser Trp Ser Phe Ser Ser Gly Gly Tyr
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 36
 <211> 111
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> моновалентные нанотела против CXCR2
 <400> 36
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Val Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Ile Phe Arg Leu Ser
 20 25 30
 Ala Leu Gly Trp Thr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Ala Arg Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Asn Ser Asp Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu
 65 70 75 80
 His Met Asp Met Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Ser Gly Lys Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 37
<211> 115
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные нанотела против CXCR2

<400> 37

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 Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp Phe Lys
20 25 30

Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val
35 40 45

Ala Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Met His Tyr Ala Glu Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala 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 Lys
85 90 95

Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 38
<211> 120
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные нанотела против CXCR2

<400> 38

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp His Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39
<211> 126
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные нанотела против CXCR2

<400> 39

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg Ile Asn
20 25 30

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

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

037063

Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala Arg Thr
100 105 110

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

<210> 40
<211> 124
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные нанотела против CXCR2

<400> 40

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 Leu
20 25 30

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

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

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

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

<210> 41
<211> 124
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные нанотела против CXCR2

<400> 41

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 Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val
50 55 60

Lys Gly 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 Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala
100 105 110

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

<210> 42
<211> 122
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные нанотела против CXCR2

<400> 42

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 Arg Ile Phe Ser Ser Asn
20 25 30

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

Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser
50 55 60

037063

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

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

Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43
<211> 115
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные нанотела против CXCR2

<400> 43

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn
20 25 30

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

Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 44
<211> 287
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> мультивалентные нанотела против CXCR2

<400> 44

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 Ser Ile Val Arg Ile Asn
20 25 30

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

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

Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala Arg Thr
100 105 110

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser 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 Pro Gly
165 170 175

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg Ile
180 185 190

Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu
195 200 205

037063

Val Ala Asp Ile Thr Ser Gly Gly Asn Ile Asn Tyr Ile Asp Ala Val
 210 215 220

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Thr Val Tyr
 225 230 235 240

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 245 250 255

Asn Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala Arg
 260 265 270

Thr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 275 280 285

<210> 45
 <211> 257
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> мультивалентные нанотела против CXCR2

<400> 45

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

Ser Val Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Ile Phe Arg Leu Ser
 20 25 30

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

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

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

His Met Asp Met Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Ser Gly Lys Tyr Arg 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 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 130 135 140

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 145 150 155 160

Gly Gly Ser Val Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Ile Phe Arg
 165 170 175

Leu Ser Ala Leu Gly Trp Thr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Ala Arg Glu
 180 185 190

Trp Val Ala Gly Ile Asn Ser Asp Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Pro
 195 200 205

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ile
 210 215 220

Tyr Leu His Met Asp Met Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 225 230 235 240

Cys Ala Ser Gly Lys Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 245 250 255

Ser

<210> 46
 <211> 276
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2

<400> 46

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn
 20 25 30

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

037063

Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp 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 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 145 150 155 160

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly
 165 170 175

Ser Ile Val Arg Ile Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly
 180 185 190

Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Asp Ile Thr Ser Gly Gly Asn Ile Asn
 195 200 205

Tyr Ile Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr
 210 215 220

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 225 230 235 240

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp
 245 250 255

Thr Gln Arg Ala Arg Thr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
 260 265 270

Thr Val Ser Ser
 275

<210> 47
 <211> 276
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2

<400> 47

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 Ser Ile Val Arg Ile Asn
 20 25 30

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

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

Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala Arg Thr
 100 105 110

Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser 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 Glu Leu Val Gln Pro Gly
 165 170 175

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile
 180 185 190

Asn Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu
 195 200 205

037063

Val Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val
 210 215 220

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met Tyr
 225 230 235 240

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 245 250 255

Met Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
 260 265 270

Thr Val Ser Ser
 275

<210> 48
 <211> 261
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2

<400> 48

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn
 20 25 30

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

Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp 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
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 145 150 155 160

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Val Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly
 165 170 175

Ile Ile Phe Arg Leu Ser Ala Leu Gly Trp Thr Arg Gln Gly Pro Gly
 180 185 190

Lys Ala Arg Glu Trp Val Ala Gly Ile Asn Ser Asp Gly Thr Thr Asn
 195 200 205

Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 210 215 220

Lys Asn Thr Ile Tyr Leu His Met Asp Met Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 225 230 235 240

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Lys Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln
 245 250 255

Val Thr Val Ser Ser
 260

<210> 49
 <211> 261
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2

<400> 49

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

Ser Val Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Ile Phe Arg Leu Ser
 20 25 30

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

037063

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

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

His Met Asp Met Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Gly Lys Tyr Arg 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 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro
145 150 155 160

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr
165 170 175

Ile Asn Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu
180 185 190

Leu Val Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser
195 200 205

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met
210 215 220

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
225 230 235 240

Cys Met Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
245 250 255

Val Thr Val Ser Ser
260

<210> 50
<211> 272
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2
<400> 50

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 Ser Ile Val Arg Ile Asn
20 25 30

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

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

Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala Arg Thr
100 105 110

Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser 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 Pro Gly
165 170 175

Gly Ser Val Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Ile Phe Arg Leu
180 185 190

Ser Ala Leu Gly Trp Thr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Ala Arg Glu Trp
195 200 205

037063

Val Ala Gly Ile Asn Ser Asp Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val
 210 215 220

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ile Tyr
 225 230 235 240

Leu His Met Asp Met Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 245 250 255

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

<210> 51
 <211> 272
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2

<400> 51

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

Ser Val Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Ile Phe Arg Leu Ser
 20 25 30

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

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

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

His Met Asp Met Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Ser Gly Lys Tyr Arg 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 Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 130 135 140

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 145 150 155 160

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg
 165 170 175

Ile Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gln Arg Glu
 180 185 190

Leu Val Ala Asp Ile Thr Ser Gly Gly Asn Ile Asn Tyr Ile Asp Ala
 195 200 205

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Thr Val
 210 215 220

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 225 230 235 240

Cys Asn Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala
 245 250 255

Arg Thr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 260 265 270

<210> 52
 <211> 239
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2

<400> 52

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn
 20 25 30

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

Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys
 50 55 60

037063

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

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

Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp 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 Glu Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
130 135 140

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn Ala Met Gly Trp
145 150 155 160

Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Val Arg Arg Thr
165 170 175

Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
180 185 190

Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser
195 200 205

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

Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
225 230 235

<210> 53
<211> 274
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2

<400> 53

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 Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp Phe Lys
20 25 30

Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val
35 40 45

Ala Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Met His Tyr Ala Glu Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala 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 Lys
85 90 95

Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp 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 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
145 150 155 160

Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
165 170 175

Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
180 185 190

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val
195 200 205

Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
210 215 220

Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
225 230 235 240

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr
245 250 255

Leu Gly His Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
260 265 270

Ser Ser

<210> 54
 <211> 272
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2
 <400> 54

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 Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp Phe Lys
 20 25 30

Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val
 35 40 45

Ala Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Met His Tyr Ala Glu Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala 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 Lys
 85 90 95

Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 145 150 155 160

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly
 165 170 175

Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
 180 185 190

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser
 195 200 205

Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 210 215 220

Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
 225 230 235 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser
 245 250 255

Phe Pro Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 260 265 270

<210> 55
 <211> 283
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2
 <400> 55

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val
 50 55 60

Lys Gly 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 Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala
 100 105 110

037063

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 Ser Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
 145 150 155 160
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser
 165 170 175
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Ala
 180 185 190
 Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
 195 200 205
 Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys
 210 215 220
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu
 225 230 235 240
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 245 250 255
 Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala Tyr
 260 265 270
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 275 280
 <210> 56
 <211> 281
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2
 <400> 56
 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 Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly 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 Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala
 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 Glu
 145 150 155 160
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 165 170 175
 Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala
 180 185 190
 Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
 195 200 205
 Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala
 210 215 220
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 225 230 235 240
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 245 250 255

Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp Gly
260 265 270

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 57
<211> 279
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2

<400> 57

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 Arg Ile Phe Ser Ser Asn
20 25 30

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

Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser 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 Pro Gly Gly Ser Leu Arg
165 170 175

Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Gly
180 185 190

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile
195 200 205

Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly
210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
225 230 235 240

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
245 250 255

Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
260 265 270

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275

<210> 58
<211> 274
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2

<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 Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val
50 55 60

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

037063

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala
 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 Glu
 145 150 155 160
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Glu Ser
 165 170 175
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp Phe Lys Val
 180 185 190
 Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val Ala
 195 200 205
 Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Met His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
 210 215 220
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Val
 245 250 255
 Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
 260 265 270
 Ser Ser
 <210> 59
 <211> 272
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2
 <400> 59
 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 Arg Ile Phe Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60
 Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser 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 Ala Gly Glu Ser Leu Arg
 165 170 175
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp Phe Lys Val Met Gly
 180 185 190
 Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val Ala Ala Ile
 195 200 205
 Arg Leu Ser Gly Asn Met His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe
 210 215 220
 Thr Ile Ser Lys Ala Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
 225 230 235 240

037063

Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Val Asn Ile
 245 250 255

Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 260 265 270

<210> 60
 <211> 281
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2

<400> 60

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 Arg Ile Phe Ser Ser Asn
 20 25 30

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

Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60

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

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

Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
 145 150 155 160

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg
 165 170 175

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Gly
 180 185 190

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile
 195 200 205

Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys Gly Arg
 210 215 220

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu Gln Met
 225 230 235 240

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp
 245 250 255

Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala Tyr Trp Gly
 260 265 270

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 275 280

<210> 61
 <211> 281
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2

<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 Val Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg Ile Asn
 20 25 30

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

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

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

037063

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

Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala Arg Thr
100 105 110

Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser 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 Ala Gly
165 170 175

Gly Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ile
180 185 190

Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu
195 200 205

Val Ala Ala Arg Asp Arg Gly Gly Tyr Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val
210 215 220

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Pro Thr Met Tyr
225 230 235 240

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
245 250 255

His Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly
260 265 270

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 62
<211> 277
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2

<400> 62

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 Arg Ile Phe Ser Ser Asn
20 25 30

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

Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser 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 Ala Gly Gly Ser Leu Thr
165 170 175

Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ile Asn Thr Met Gly
180 185 190

Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala Arg
195 200 205

Asp Arg Gly Gly Tyr Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
210 215 220

037063

Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Pro Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn
 225 230 235 240

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Ala Gly Thr
 245 250 255

Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 260 265 270

Val Thr Val Ser Ser
 275

<210> 63
 <211> 279
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2

<400> 63

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val
 50 55 60

Lys Gly 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 Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala
 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 Ser
 130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 145 150 155 160

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser
 165 170 175

Leu Thr Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ile Asn Thr
 180 185 190

Met Gly Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
 195 200 205

Ala Arg Asp Arg Gly Gly Tyr Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly
 210 215 220

Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Pro Thr Met Tyr Leu Gln
 225 230 235 240

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Ala
 245 250 255

Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln Gly
 260 265 270

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 275

<210> 64
 <211> 272
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2

<400> 64

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn
 20 25 30

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

037063

Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp 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 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
145 150 155 160

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly
165 170 175

Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
180 185 190

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser
195 200 205

Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
210 215 220

Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
225 230 235 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser
245 250 255

Phe Pro Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265 270

<210> 65
<211> 274
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2
<400> 65

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn
20 25 30

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

Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp 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 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
145 150 155 160

Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
165 170 175

Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
180 185 190

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val
195 200 205

Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
210 215 220

037063

Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
225 230 235 240

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr
245 250 255

Leu Gly His Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
260 265 270

Ser Ser

<210> 66
<211> 272
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2
<400> 66

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 Arg Ile Phe Ser Ser Asn
20 25 30

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

Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145 150 155 160

Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
165 170 175

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn Ala Met Gly
180 185 190

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Val Arg Arg
195 200 205

Thr Arg Gly Gly Ser Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
210 215 220

Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn
225 230 235 240

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Met Leu Asp Asp
245 250 255

Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265 270

<210> 67
<211> 274
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2
<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 Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val
50 55 60

037063

Lys Gly 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 Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala
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 Glu
145 150 155 160

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
165 170 175

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn Ala
180 185 190

Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Val
195 200 205

Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys Gly
210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met Tyr Leu Gln
225 230 235 240

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Met Leu
245 250 255

Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
260 265 270

Ser Ser

<210> 68
<211> 277
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2

<400> 68

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser 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 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
165 170 175

Cys Val Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Gly Trp Phe
180 185 190

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp
195 200 205

037063

Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe
 210 215 220

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
 225 230 235 240

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Gly
 245 250 255

Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 260 265 270

Val Thr Val Ser Ser
 275

<210> 69
 <211> 279
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательности мультивалентных нанотел против CXCR2

<400> 69

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser 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 Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 165 170 175

Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Gly Trp Phe
 180 185 190

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp
 195 200 205

Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 210 215 220

Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 225 230 235 240

Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Lys Asp
 245 250 255

Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 260 265 270

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 275

<210> 70
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> fr1

<400> 70

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
 20 25 30

037063

<210> 71
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> fr1

 <400> 71

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

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Leu Ser Gly Arg Ile Gly Ser
 20 25 30

 <210> 72
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR1

 <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 Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp
 20 25 30

 <210> 73
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR1

 <400> 73

 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 Gly Leu Ile Phe Arg
 20 25 30

 <210> 74
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR1

 <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
 20 25 30

 <210> 75
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR1

 <400> 75

 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
 20 25 30

 <210> 76
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR1

 <400> 76

 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 Thr Leu Ala
 20 25 30

 <210> 77
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR1

 <400> 77

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

037063

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

<210> 78
<211> 30
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FR1

<400> 78

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

Ser Val Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Ile Phe Arg
20 25 30

<210> 79
<211> 30
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FR1

<400> 79

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 Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp
20 25 30

<210> 80
<211> 30
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FR1

<400> 80

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

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

<210> 81
<211> 30
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FR1

<400> 81

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg
20 25 30

<210> 82
<211> 30
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FR1

<400> 82

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
20 25 30

<210> 83
<211> 30
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FR1

<400> 83

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
20 25 30

<210> 84
<211> 30
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>

037063

<223> FR1
 <400> 84
 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 Arg Ile Phe Ser
 20 25 30
 <210> 85
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR1
 <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 Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr
 20 25 30
 <210> 86
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR1
 <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 Thr Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Gly Thr
 20 25 30
 <210> 87
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR1
 <400> 87
 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 Met Gly Asn
 20 25 30
 <210> 88
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR1
 <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 Gly Thr Ile Gly Thr
 20 25 30
 <210> 89
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR1
 <400> 89
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Thr Phe Arg
 20 25 30
 <210> 90
 <211> 120
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> моновалентные нанотела против CXCR2
 <400> 90
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ile Asn
 20 25 30

037063

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

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

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

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

Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 91
<211> 14
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FR2

<400> 91

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

<210> 92
<211> 14
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FR2

<400> 92

Trp Tyr Arg Gln Val Ser Gly Gln Gln Arg Glu Leu Val Ala
1 5 10

<210> 93
<211> 14
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FR2

<400> 93

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

<210> 94
<211> 14
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FR2

<400> 94

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gln Arg Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 95
<211> 14
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FR2

<400> 95

Trp Phe Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 96
<211> 14
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FR2

<400> 96

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

<210> 97
<211> 14
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FR2

<400> 97

Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Ile Ser
1 5 10

037063

<210> 98
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR2

 <400> 98
 Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
 1 5 10

 <210> 99
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR2

 <400> 99
 Trp Thr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Ala Arg Glu Trp Val Ala
 1 5 10

 <210> 100
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR2

 <400> 100
 Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val Ala
 1 5 10

 <210> 101
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR2

 <400> 101
 Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
 1 5 10

 <210> 102
 <211> 14

037063

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR2
 <400> 102
 Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
 1 5 10

<210> 103
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR2
 <400> 103
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Ala Phe Val Ala
 1 5 10

<210> 104
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR2
 <400> 104
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
 1 5 10

<210> 105
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR2
 <400> 105
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
 1 5 10

<210> 106
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR2
 <400> 106
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Val
 1 5 10

<210> 107
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR2
 <400> 107
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
 1 5 10

<210> 108
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR2
 <400> 108
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val Ala
 1 5 10

<210> 109
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR2
 <400> 109
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
 1 5 10

<210> 110
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR2
 <400> 110

037063

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

<210> 111
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR3

<400> 111

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

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Thr
 20 25 30

<210> 112
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR3

<400> 112

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

Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala
 20 25 30

<210> 113
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR3

<400> 113

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

Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
 20 25 30

<210> 114
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR3

<400> 114

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Glu Asn Thr Trp Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Asn Thr
 20 25 30

<210> 115
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR3

<400> 115

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

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

<210> 116
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR3

<400> 116

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

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

<210> 117
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR3

037063

<400> 117
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
 20 25 30

<210> 118
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR3

<400> 118
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu His
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
 20 25 30

<210> 119
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR3

<400> 119
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu His
 1 5 10 15
 Met Asp Met Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser
 20 25 30

<210> 120
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR3

<400> 120
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Val
 20 25 30

<210> 121
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR3

<400> 121
 Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Pro Thr Met Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Ala
 20 25 30

<210> 122
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR3

<400> 122
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala
 20 25 30

<210> 123
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR3

<400> 123
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Val Ala Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
 20 25 30

<210> 124
 <211> 32

037063

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR3
 <400> 124
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
 20 25 30
 <210> 125
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR3
 <400> 125
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
 20 25 30
 <210> 126
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR3
 <400> 126
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Met Leu
 20 25 30
 <210> 127
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR3
 <400> 127
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Tyr Asn Val
 20 25 30
 <210> 128
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR3
 <400> 128
 Arg Phe Thr Ile Ala Arg Asp Asn Ile Leu Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Tyr Asn Val
 20 25 30
 <210> 129
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR3
 <400> 129
 Arg Phe Thr Ile Gly Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Tyr Asn Ile
 20 25 30
 <210> 130
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> FR3
 <400> 130
 Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Pro Thr Met Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

037063

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Ala
 20 25 30

<210> 131
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR4

<400> 131

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

<210> 132
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR4

<400> 132

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

<210> 133
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR4

<400> 133

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

<210> 134
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR1

<400> 134

Asp Tyr Ala Ile Gly
 1 5

<210> 135
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR1

<400> 135

Leu Ser Gly Met Ala
 1 5

<210> 136
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR1

<400> 136

Asn Tyr Ala Met Gly
 1 5

<210> 137
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR1

<400> 137

Arg Ser Ala Met Gly
 1 5

<210> 138
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR1

<400> 138

Tyr Tyr Thr Val Gly
 1 5

<210> 139
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

```

<220>
<223> CDR1

<400> 139
Tyr Tyr Val Met Ala
1 5

<210> 140
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 140
Leu Ser Ala Leu Gly
1 5

<210> 141
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 141
Phe Lys Val Met Gly
1 5

<210> 142
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 142
Ile Asn Thr Met Gly
1 5

<210> 143
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 143
Ile Asn Thr Met Gly
1 5

<210> 144
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 144
Ser Leu Ser Met Gly
1 5

<210> 145
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 145
Asp Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 146
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 146
Ser Asn Ala Met Gly
1 5

<210> 147
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 147
Ile Asn Ala Met Gly
1 5

```

```

<210> 148
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 148

Ile Asn Ala Met Gly
1 5

<210> 149
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 149

Ile Asn Ala Met Gly
1 5

<210> 150
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 150

Ile Arg Ala Met Gly
1 5

<210> 151
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 151

Ile Asn Thr Met Gly
1 5

<210> 152
<211> 17
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR2

<400> 152

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

Gly

<210> 153
<211> 16
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR2

<400> 153

Val Ser Arg Ser Gly Gly Ser Thr Asp Ile Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 154
<211> 17
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR2

<400> 154

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

Gly

<210> 155
<211> 16
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR2

<400> 155

Val Leu Thr Lys Asp Gly Thr Leu His Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly
1 5 10 15

```

037063

<210> 156
 <211> 17
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDR2

 <400> 156
 Ala Ile Asn Lys Ser Gly Gly Asn Thr His Tyr Ala Gly Ser Val Lys
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 157
 <211> 17
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDR2

 <400> 157
 Gly Ile Ser Trp Gly Gly Asp Asn Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 158
 <211> 17
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDR2

 <400> 158
 Cys Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 159
 <211> 17
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDR2

 <400> 159
 Ala Ile Ser Thr Arg Gly Ser Met Thr Lys Tyr Ser Asp Ser Val Gln
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 160
 <211> 16
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDR2

 <400> 160
 Gly Ile Asn Ser Asp Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly
 1 5 10 15

 <210> 161
 <211> 16
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDR2

 <400> 161
 Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Met His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

 <210> 162
 <211> 16
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDR2

 <400> 162
 Ala Arg Asp Arg Gly Gly Tyr Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

 <210> 163
 <211> 16
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

```

<220>
<223> CDR2
<400> 163
Asp Ile Thr Ser Gly Gly Asn Ile Asn Tyr Ile Asp Ala Val Lys Gly
1           5             10             15

<210> 164
<211> 17
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR2
<400> 164
Ala Leu Thr Arg Asn Gly Gly Tyr Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1           5             10             15

Gly

<210> 165
<211> 17
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR2
<400> 165
Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys
1           5             10             15

Gly

<210> 166
<211> 18
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR2
<400> 166
Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala
1           5             10             15

Lys Gly

<210> 167
<211> 16
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR2
<400> 167
Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys Gly
1           5             10             15

<210> 168
<211> 16
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR2
<400> 168
Val Ile Thr Ser Gly Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1           5             10             15

<210> 169
<211> 16
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR2
<400> 169
Lys Ile Thr Arg Gly Gly Ala Ile Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1           5             10             15

<210> 170
<211> 16
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR2
<400> 170
Leu Ile Thr Ser Thr Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1           5             10             15

```

037063

<210> 171
 <211> 16
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDR2

 <400> 171
 Ala Arg Asp Arg Gly Gly Tyr Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

 <210> 172
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDR3

 <400> 172
 Val Arg Gly Thr Ala Arg Asp Leu Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 173
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDR3

 <400> 173
 His Thr Ser Ser Tyr Ser Asn Trp Arg Val Tyr Asn Asn Asp Tyr
 1 5 10 15

 <210> 174
 <211> 17
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDR3

 <400> 174
 Tyr Trp Gly Leu Thr Leu Arg Leu Trp Met Pro Pro His Arg Tyr Asp
 1 5 10 15

 Tyr

 <210> 175
 <211> 3
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDR3

 <400> 175
 Gly Arg Tyr
 1

 <210> 176
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDR3

 <400> 176
 Ser Arg Thr Asn Pro Lys Pro Asp Tyr
 1 5

 <210> 177
 <211> 13
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDR3

 <400> 177
 Arg Tyr Arg Gly Gly Ala Ala Val Ala Gly Trp Glu Tyr
 1 5 10

 <210> 178
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDR3

 <400> 178
 Asp Arg Arg Thr Asp Cys Lys Lys Gly Arg Val Gly Ser Gly Ser
 1 5 10 15

 <210> 179
 <211> 16
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

037063

```

<220>
<223> CDR3
<400> 179
Asp Pro Arg Gly Ser Ser Trp Ser Phe Ser Ser Gly Gly Tyr Asp Tyr
1          5          10          15

<210> 180
<211> 3
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3
<400> 180
Gly Lys Tyr
1

<210> 181
<211> 7
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3
<400> 181
Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr
1          5

<210> 182
<211> 12
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3
<400> 182
Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp His
1          5          10

<210> 183
<211> 18
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3
<400> 183
Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala Arg Thr Gly
1          5          10          15

Asn Tyr

<210> 184
<211> 15
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3
<400> 184
Asp Ser Leu Ser Gly Ser Asp Tyr Leu Gly Thr Asn Leu Asp Tyr
1          5          10          15

<210> 185
<211> 15
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3
<400> 185
Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala Tyr
1          5          10          15

<210> 186
<211> 12
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3
<400> 186
Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr
1          5          10

<210> 187
<211> 7
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3

```

```

<400> 187
Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr
1                               5

<210> 188
<211> 8
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3

<400> 188
Glu Thr Val Val Gly Ala Val Tyr
1                               5

<210> 189
<211> 8
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3

<400> 189
Asp Gly Gly Pro Ser Gln Asn Tyr
1                               5

<210> 190
<211> 7
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3

<400> 190
Glu Thr Leu Arg Arg Asn Tyr
1                               5

<210> 191
<211> 12
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3

<400> 191
Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg
1                               5                10

<210> 192
<211> 357
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 192
gaggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc   60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctactgga tgtattgggt cegtcaggct   120
ccagggaagc ggctcgcact ggtctcagct attaatgctg ttggtgatag cacatactat   180
gcagaccocg tgaaggcccg attcaccatc tccagagaca acaacaagaa cacgctgtat   240
ctgcagatga acagcctgaa acctgaggac acggccctgt attactgtgc gaccgtacga   300
ggcacagctc gtgacttgya ctactggggc caggggaccc agytaccct ctcctca    357

<210> 193
<211> 369
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 193
gaggtgaagc tggtagagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc   60
tcctgtgcac tctctggaag gatcggcagt atcaacgcca tgggctggta tcgcccaggt   120
tcaggacaac agcgcgaatt ggtcgcagta agcaggagcg gaggtagcac agacattgct   180
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg gcaagaacac agtgtatctg   240
cagatggaca gcttgaaac tgaggacacg gccctctatt actgttatgc tcatacttca   300
agctatagta attggcagat ctacaataac gactactggg gccaggggac ccaggtcacc   360
gtctcctca                                     369

<210> 194
<211> 348
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 194
gaggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc   60
acctgtgcag cctctggacg catcggcact atcaatgcca tgggctggta ccgccaggct   120

```

037063

```

ccaggaagc agcgcgagtt ggtcgcagtt attactagtg gtgtaggat agactatgca 180
gactcogtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac ggtgtatctg 240
caaatgaaca gcttgaaac tgaggacacg gccgtctatt actataatgt agaaacggta 300
gtgggtgccg tctactgggg ccaggggacc caggtcacgc tctcctca 348

<210> 195
<211> 348
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 195
gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc 60
tctctgtcag cctctggaag gatgggcaat atcaatgcca tgggctggta tgcaccaggct 120
ccaggaagc agcgcgagtt ggtcgcacaa attactaggg gtggtgcgat aacctatgca 180
gactcogtga agggccgatt caccatctcc agagacaata tcttgaacac ggcgtatctg 240
caaatgaacg acctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt attataatgt agatgggggg 300
cccagtcaaa actactgggg ccaggggacc caggtcacgc tctcctca 348

<210> 196
<211> 378
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 196
gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc 60
tctctgtcag cctctggatt cactttogat gattatgcca taggctgggt ccgccaggcc 120
ccaggaagc agcgtgagag ggtctcatgt attagtggta gtgatggtag cacatactat 180
gcagactccg tcaaggcccg attcaccatc tccagtgcac acgccaagaa cacggctgat 240
ctgcacatga acaacctgaa acccgaggac acggccgttt attattgtgc agcatattgg 300
ggactaacgc tcaggctatg gatccccccc caccggtagt actactgggg ccaggggacc 360
caggtcacgc tctcctca 378

<210> 197
<211> 333
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 197
gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc 60
tctctgtcag cctctggact tatcttcaag ctccagtggca tggcctggta tgcaccaggct 120
ccggggagcc agcgcgagtg ggtcgcagtg cttaccaaaag atggtagcct acaactatgca 180
gacccocgtga agggccgatt caccatctcc agaaacaacg ccgagaacac gtggtatctg 240
caaatgaaca gcttgaaac tgaggacaca gccatctatt actgtaatac gggccgttac 300
tggggccagg ggaccaggt caccgtctcc tca 333

<210> 198
<211> 345
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 198
gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc actgagactc 60
tctctgtcag cctctggaac catcgccacg atcagagcca tgggctggta ccgccaggct 120
ccaggaagc agcgcgagtt ggtcgcattg attactagta ctgtaggat aaactatgca 180
gactcogtga agggccgatt caccattgga agagacaatg ccaagaacac ggcgtatctg 240
caaatgaaca acctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt actataatat cgaaacacta 300
cagctaacct actggggcca ggggaccagc gtcaccgtct cctca 345

<210> 199
<211> 354
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 199
gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc 60
tctctgtcag cctctggaag caccttagt aactatgcca tgggctggta ccgccaggcc 120
acaggaagc agcgtgagtt tgtagcagct attaacaaga gtggtaggaa cacacactat 180
gcaggtctcc tgaaggcccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacggctgat 240
ctgcaaatga acagcctgaa acctagggac acggccgttt attactgtgc agcgtcggg 300
actaacctca agcctgacta ctggggccag gggaccaggc tcaccgtctc cta 354

```

037063

```

<210> 200
<211> 366
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 200
gaggtgcagc tggaggagtc tggggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggagc ctccttcagt cgcagtgcga tgggctggct ccgccagget      120
ccagggaagg agcgtgaatt tgtagcaggt attagctggg gtggtgataa ctacatactat      180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa caccgtgtct      240
ctacaatga acagcctgaa acctcaggac acggccgttt attactgtgc agcaagatac      300
cggggaggcg cggcagtagc tggttgggag taactggggcc aggggaacca ggtcacccgtc      360
tcctca                                          366

<210> 201
<211> 372
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 201
gaggtgcagc tggaggagtc tggggagggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc      60
tcctgtgcag cctccggatc cactttggcc tattataccg taggctggtt ccgccgggccc      120
ccagggaagg agcgcgaggg gatctcatgt attagtagta gtgatggtag cacatactat      180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa tacgggtgat      240
ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc ggcgtgacaga      300
cgtaccgact gtaaaaaggg tagagtcggt tctggttcct ggggccaagg gaccacagctc      360
accgtctcct ca                                          372

<210> 202
<211> 375
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 202
aaggtgcagc tggaggagtc tggggagggc ctgggtgcagc ctggggggtc tctgagactc      60
tcctgtgcag cctccggagc cgccttcaat tactatgtca tggcctggtt ccgccagget      120
caagggaagg agcgtgagtt tgtagcagct attagcacgc gtggtagtat gacaaagtat      180
tcagactccg tgcagggccc gttcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgggtgat      240
ctgcacatga acagcctgaa acctgaggat acggccgttt attactgtgc agcagaccct      300
cgcggcagta gctggtcaat ttcgtccggg ggttatgact actggggcca ggggaccag      360
gtcacccgtc cctca                                          375

<210> 203
<211> 333
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 203
gaggtgcagc tggaggagtc tggggagggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc      60
tcctgtgtag cctctggaat catcttcaga ctcagtgcgt tgggttggac acgccaggggt      120
ccaggaaaag cgcgcgagtg ggtcgcaggt attaacagtg atggtacgac caactacgcc      180
gaccccgtaa agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac gatatactcg      240
cacatggaca tgetgaaacc tgaggatacg gccctctatt actgtgcctc cggaaaagtae      300
cggggccagg gaaccaggt caccgtctcc tca                                          333

<210> 204
<211> 345
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 204
gaggtgcagc tggaggagtc tggggagggc ttggtgcagg ctggggagtc tctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggaag caccttcgat tcaaaagta tgggctggta ccgccagcct      120
ccagggaagg agcgcgaggg ggtcgcagcg attagctta gtggtaacat gcactatgca      180
gagtcctgta agggccgatt caccatctcc aaagccaacg ccaagaacac agtgtatctg      240
caaatgaaca gectgagacc tgaggacaac gccctctatt actgtaaggt gaacattcgg      300
ggccaggact actggggcca ggggaccag gtcaccgtct cctca                                          345

<210> 205
<211> 360

```

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 205
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc tctgacgctc 60
 tcctgtgcag tctctgaaag ctcttcaga atcaatacca tgggttqata ccgcccagct 120
 ccagggaagc agcgcgagtt ggtcgcagct cgtgatagag gtggttacat aaactatgta 180
 gattccgtga agggccgatt caccgtctcc agagacaacg ccaagccac aatgtatctg 240
 caaatgaaca gcttgaaac tgagacacg gccgtctatt attgtcatgc cgggacccaa 300
 gatcggacgg gtcggaatt cgaaccactgg ggccagggga cccaggtcac cgtctctca 360

<210> 206
 <211> 378
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 206
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
 tcctgtgtag cctctggaag catcgtcaga attaatacca tgggctggtg ccgccaagact 120
 ccagggaagc agcgcgagtt ggtcgcagat attaccagtg gtggtaacat aaactatata 180
 gacgcgctga agggccgatt caccatctcc agagacaaca ccaagaacac ggtgtatctg 240
 caaatgaaca gcttgaaac tgagacacg gccgtctatt actgtaatgc agagatcgtt 300
 gttctggtgg gagtttggac ccaagctgag cggaccggca actactgggg ccaggggacc 360
 caggtcacgg tctctca 378

<210> 207
 <211> 372
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 207
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagga ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggagc cacttcagt agctgtcca tgggctggtt ccgccaagct 120
 ccggggaagc agcgtgcct ttagcagcg cttactcga atggtggta cagatactat 180
 gcagactccg tgaaggccc attcaccat tccagagacg tcgccaagaa gacctatata 240
 ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggcctct attactgtgc agcagatagt 300
 cttagtggta gtgactact aggaaccaac ctagactact ggggccaagg gaccaggtc 360
 accgtctct ca 372

<210> 208
 <211> 372
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 208
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggagc cacttcagt gactatgcca tgggctggtt ccgccaagct 120
 ccagggaagc agcgtgagtt ttagcagct attacgtgga atggtgtag agtattttat 180
 actgcctccg tgaaggccc attcaccat tccagagaca acgccaagaa cacgatgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggcctttt attactgtgc agcagataaa 300
 gacagacgta ctgactatct agggcacccc gttgctact ggggccaagg gaccaggtc 360
 accgtctct ca 372

<210> 209
 <211> 366
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 209
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagga ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
 tcctgtgtag cctctggagc catcttcagt agcaatgcca tgggctggtt ccgccaagct 120
 ccagggaagc agcgtgagtt ttagcggcc attacctgga ggagtggcgg tagcgcgtac 180
 tatgcagact ccgcgaagg ccgattcacc atctccagag acaacgcaa gaacacggtg 240
 tatttgcaaa tgaacagcct gaaacctgag gacacggccg tttattattg tgcagctggt 300
 ggtagtctct ggttaagttt tccgcccagc tactggggcc aggggaccca ggtcacctgc 360
 tctca 366

<210> 210
 <211> 345
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

037063

```

<220>
<223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 210
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagag ttggtgcagc cgggggggtc tctgagactc      60
tctgtgcag cctctggaag catcttaact atcaatgccca tgggctggta ccgcccagcct      120
ccaggggaagc agcgcgagtt ggtagtcogt aggactaggg gtggtagtac aacgtatcaa      180
gactccgtga agggccgatt caccatctcc gcagacattg ccaagaaaac gatgtatctc      240
caaatgaaca gcttgaaac tgaagacacg gccgtctatt actgtatgct agatgacctg      300
gggggtgtct actggggcca ggggaccag gtcaccgtct cctca      345

<210> 211
<211> 360
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Нуклеиновая кислота, кодирующая моновалентное нанотело

<400> 211
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaagc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagcctc      60
tctgtgcag tctctggaag caccttcaga atcaatacca tgggctggta ccgcccggct      120
ccaggggaagc agcgcgagtt ggtgcagct cgtgatagag gtggtacat aaactatgta      180
gatccgtga agggccgatt caccgtctcc agagacaacg ccaagcccac aatgtatctg      240
caaatgaaca gcttgaaac tgaggacacg gccgtctatt attgtcagc cgggacccaa      300
gatcgacgg gtgcgaatt cgaccgtgg gccaagggga cccaggtcac cgtctcctca      360

<210> 212
<211> 109
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 212
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser 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> 213
<211> 115
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотные последовательности вариантов с оптимизированными
последовательностями

<400> 213
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn
20         25         30

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

Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys
50         55         60

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

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

Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100        105        110

Val Ser Ser
115

<210> 214

```

037063

<211> 115
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотные последовательности вариантов с оптимизированными последовательностями
 <400> 214
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ser Lys Asn Thr Met Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Leu
 85 90 95
 Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115
 <210> 215
 <211> 126
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотные последовательности вариантов с оптимизированными последовательностями
 <400> 215
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg Ile Asn
 20 25 30
 Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Asp Ile Thr Ser Gly Gly Asn Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser 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 Asn
 85 90 95
 Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala Arg Thr
 100 105 110
 Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 216
 <211> 115
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотные последовательности вариантов с оптимизированными последовательностями
 <400> 216
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp Phe Lys
 20 25 30
 Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Arg His Tyr Ala Glu Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Ala Asn Ser 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 Lys
 85 90 95

Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 217
 <211> 122
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотные последовательности вариантов с оптимизированными последовательностями

<400> 217
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ser Asn
 20 25 30

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

Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60

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

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

Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 218
 <211> 124
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотные последовательности вариантов с оптимизированными последовательностями

<400> 218
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala 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 Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 219
 <211> 120
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотные последовательности вариантов с оптимизированными последовательностями

<400> 219
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

037063

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

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

Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 220
<211> 35
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Пептидный линкер

<400> 220

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 Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

<210> 221
<211> 272
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотные последовательности бипаратов с оптимизированными последовательностями

<400> 221

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

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

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

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Ala Asn Ser 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 Lys
85 90 95

Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
145 150 155 160

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
165 170 175

Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
180 185 190

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser
195 200 205

Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
210 215 220

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
225 230 235 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser
245 250 255

Phe Pro Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
260 265 270

<210> 222
<211> 274

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотные последовательности бипаратов с оптимизированными последовательностями
 <400> 222
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp Phe Lys
 20 25 30
 Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Arg His Tyr Ala Glu Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Ala Asn Ser 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 Lys
 85 90 95
 Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu 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 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 165 170 175
 Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
 180 185 190
 Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val
 195 200 205
 Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 210 215 220
 Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
 225 230 235 240
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr
 245 250 255
 Leu Gly His Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 260 265 270
 Ser Ser
 <210> 223
 <211> 277
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотные последовательности бипаратов с оптимизированными последовательностями
 <400> 223
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ile Asn
 20 25 30
 Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Ala Arg Asp Arg Gly Gly Tyr Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Pro Thr Met Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His
 85 90 95
 Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser 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 Leu
 145 150 155 160
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 165 170 175
 Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Gly Trp Phe
 180 185 190
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp
 195 200 205
 Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 210 215 220
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
 225 230 235 240
 Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Gly
 245 250 255
 Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 260 265 270
 Val Thr Val Ser Ser
 275
 <210> 224
 <211> 279
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотные последовательности бипаратов с оптимизированными
 последовательностями
 <400> 224
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ile Asn
 20 25 30
 Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Ala Arg Asp Arg Gly Gly Tyr Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Pro Thr Met Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His
 85 90 95
 Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser 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 Leu
 145 150 155 160
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 165 170 175
 Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Gly Trp Phe
 180 185 190
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp
 195 200 205
 Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 210 215 220
 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 225 230 235 240
 Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Lys Asp
 245 250 255

037063

Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 260 265 270

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 275

<210> 225
 <211> 422
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Аминокислотные последовательности Сипаратопов с оптимизированными последовательностями

<400> 225

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

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

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

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Ala Asn Ser 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 Lys
 85 90 95

Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
 145 150 155 160

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 165 170 175

Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
 180 185 190

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser
 195 200 205

Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 210 215 220

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
 225 230 235 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser
 245 250 255

Phe Pro Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 260 265 270

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 275 280 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 290 295 300

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 305 310 315 320

Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 325 330 335

Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 340 345 350

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala
 355 360 365

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr
 370 375 380

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
 385 390 395 400

Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr
 405 410 415
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 420
 <210> 226
 <211> 426
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотные последовательности бипаратов с оптимизированными
 последовательностями
 <400> 226
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp Phe Lys
 20 25 30
 Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Arg His Tyr Ala Glu Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Ala Asn Ser 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 Lys
 85 90 95
 Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 165 170 175
 Ser Ile Val Arg Ile Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly
 180 185 190
 Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Asp Ile Thr Ser Gly Gly Asn Ile Asn
 195 200 205
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 210 215 220
 Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
 225 230 235 240
 Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp
 245 250 255
 Thr Gln Arg Ala Arg Thr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 260 265 270
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 275 280 285
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 290 295 300
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 305 310 315 320
 Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 325 330 335
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
 340 345 350
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp
 355 360 365
 Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 370 375 380
 Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
 385 390 395 400

037063

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser
 405 410 415

Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 420 425

<210> 227
 <211> 424
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Аминокислотные последовательности бипаратопов с оптимизированными последовательностями

<400> 227

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

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

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

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Ala Asn Ser 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 Lys
 85 90 95

Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu 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
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
 145 150 155 160

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 165 170 175

Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
 180 185 190

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val
 195 200 205

Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 210 215 220

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
 225 230 235 240

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr
 245 250 255

Leu Gly His Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 260 265 270

Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 275 280 285

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 290 295 300

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 305 310 315 320

Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 325 330 335

Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 340 345 350

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu
 355 360 365

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 370 375 380

Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
 385 390 395 400

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln
 405 410 415

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 420

<210> 228
 <211> 115
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Аминокислотные последовательности бипаратопов с оптимизированными последовательностями

<400> 228

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> 229
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR1

<400> 229

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

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

<210> 230
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR1

<400> 230

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg
 20 25 30

<210> 231
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR1

<400> 231

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

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

<210> 232
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR1

<400> 232

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

037063

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

<210> 233
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR1

<400> 233
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

<210> 234
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR1

<400> 234
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

<210> 235
 <211> 16
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR2

<400> 235
 Asp Ile Thr Ser Gly Gly Asn Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 236
 <211> 16
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR2

<400> 236
 Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Arg His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 237
 <211> 18
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR2

<400> 237
 Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 238
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR3

<400> 238
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ser Lys Lys Thr Met Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

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

<210> 239
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> FR3

<400> 239
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ser Lys Asn Thr Met Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

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

037063

<210> 240
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR3

 <400> 240
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

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

 <210> 241
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR3

 <400> 241
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Ala Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

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

 <210> 242
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR3

 <400> 242
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

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

 <210> 243
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR3

 <400> 243
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

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

 <210> 244
 <211> 32
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR3

 <400> 244
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Pro Thr Met Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

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

 <210> 245
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> FR4

 <400> 245
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

 <210> 246
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CDR1

 <400> 246
 Thr Tyr Trp Met Tyr
 1 5

```

<210> 247
<211> 14
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FR2

<400> 247

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val Ala
1 5 10

<210> 248
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 248

Ile Asn Ala Met Gly
1 5

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, направленный против или связывающийся с хемокиновым рецептором CXCR2, где полипептид содержит по меньшей мере два антигенсвязывающих домена иммуноглобулина,

где указанный полипептид включает первый антигенсвязывающий домен, находящийся в пределах одного варибельного домена первого иммуноглобулина, распознающего первый эпитоп на CXCR2, и способен связываться с линейным пептидом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, и второй антигенсвязывающий домен, находящийся в пределах одного варибельного домена антитела второго иммуноглобулина, и

где указанный второй антигенсвязывающий домен связывается с эпитопом во внешних петлях CXCR2 человека (аминокислотные остатки 106-120, 184-208 и 274-294 последовательности SEQ ID NO: 1), и

где одиночные варибельные домены первого и второго иммуноглобулина имеют структуру FR-CDR-FR-CDR-FR-CDR-FR.

2. Полипептид по п.1, в котором по меньшей мере один указанный первый и второй антигенсвязывающий домен содержится в V_{HH} -домене одной тяжелой цепи антитела с тяжелой цепью животного семейства верблюжьих или в его фрагменте или является его гуманизированным вариантом.

3. Полипептид по п.2, в котором каждый указанный антигенсвязывающий домен содержится в V_{HH} -домене одной тяжелой цепи антитела с тяжелой цепью животного семейства верблюжьих или в его фрагменте или является его гуманизированным вариантом.

4. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, где указанные по меньшей мере два антигенсвязывающих домена соединены линкером.

5. Полипептид по любому из пп.2-4, который имеет одну из нижеследующих структур:

i) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

ii) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8-линкер-HLE,

iii) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-линкер-HLE-линкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8, где

если FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 содержит первый антигенсвязывающий домен, то FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 содержит второй антигенсвязывающий домен, а если FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 содержит второй антигенсвязывающий домен, то FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 содержит первый антигенсвязывающий домен, а HLE представляет собой связывающую единицу, способствующую увеличению времени полужизни *in vivo*.

6. Полипептид по п.5, в котором указанный первый антигенсвязывающий домен выбран из SEQ ID NO: 213, 214, 216 и 219 и второй антигенсвязывающий домен выбран из SEQ ID NO: 215, 217 и 218.

7. Полипептид по п.5, в котором в указанном одном варибельном домене первого иммуноглобулина CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236 и CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181, и в указанном одном варибельном домене второго иммуноглобулина CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 237, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186.

8. Полипептид по п.7, в котором первый антигенсвязывающий домен выбран из SEQ ID NO: 216 и второй антигенсвязывающий домен выбран из SEQ ID NO: 217.

9. Полипептид по любому из пп.1-5, содержащий SEQ ID NO: 221.

10. Полипептид по п.5, в котором в указанном одном варибельном домене первого иммуноглобулина CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236, а CDR3 содержит аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 181, и в указанном одном вариабельном домене второго иммуноглобулина CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165, а CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 185.

11. Полипептид по п.10, в котором первый антигенсвязывающий домен выбран из SEQ ID NO: 216 и второй антигенсвязывающий домен выбран из SEQ ID NO: 218.

12. Полипептид по любому из пп.1-5, содержащий SEQ ID NO: 222.

13. Полипептид по п.5, в котором в указанном одном вариабельном домене первого иммуноглобулина CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 141, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236 и CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181, и в указанном одном вариабельном домене второго иммуноглобулина CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 235 и CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183.

14. Полипептид по п.5, в котором в указанном одном вариабельном домене первого иммуноглобулина CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 171 и CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191, и в указанном одном вариабельном домене второго иммуноглобулина CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 237 и CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186.

15. Полипептид по п.5, в котором в указанном одном вариабельном домене первого иммуноглобулина CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 171 и CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191, и в указанном одном вариабельном домене второго иммуноглобулина CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165 и CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 185.

16. Полипептид по п.5, в котором в указанном одном вариабельном домене первого иммуноглобулина CDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, CDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 171 и CDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191, и в указанном одном вариабельном домене второго иммуноглобулина CDR4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, CDR5 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 235 и CDR6 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183.

17. Полипептид по любому из пп.1-16, содержащий частично или полностью гуманизированные каркасные области.

18. Полипептид по пп.1-17, где указанный первый антигенсвязывающий домен связывается с эпитопом, содержащим аминокислоты F11, F14 и W15 SEQ ID NO: 1.

19. Полипептид по п.18, где указанный эпитоп является линейным.

20. Полипептид по п.19, где указанный эпитоп находится в области аминокислотных остатков 106-120 последовательности SEQ ID NO: 1.

21. Полипептид по п.19, где указанный эпитоп является конформационным.

22. Полипептид по п.21, где указанный второй антигенсвязывающий домен связывается с эпитопом CXCR2, содержащим аминокислотные остатки W112, G115, I282 и T285 SEQ ID NO: 1.

23. Полипептид по любому из пп.1-22, который был модифицирован для повышения времени полужизни *in vivo* по сравнению с временем полужизни соответствующей немодифицированной аминокислотной последовательности.

24. Полипептид по п.23, где указанное повышенное время полужизни сообщается одной или несколькими связывающими единицами, выбранными из группы, состоящей из сывороточных белков или их фрагментов, связывающих единиц, которые могут связываться с сывороточными белками, Fc-части и небольших белков или пептидов, которые могут связываться с сывороточными белками.

25. Полипептид по п.24, где связывающая единица содержит SEQ ID NO: 228 (Alb8).

26. Полипептид по пп.1-6, состоящий из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 225, 226 или 227.

27. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид по любому из пп.1-26.

28. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.27.

29. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из пп.1-26 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

30. Применение полипептида по любому из пп.1-26 для лечения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и осложнений ХОБЛ.

31. Применение полипептида по любому из пп.1-26 для лечения кистозного фиброза, астмы, астмы в тяжелой форме, обострений астмы, аллергической астмы, острого поражения легких, острого респираторного дистресс-синдрома, идиопатического фиброза легких, ремоделирования дыхательных путей, синдрома облитерирующего бронхиолита или бронхопульмонарной дисплазии.

32. Применение полипептида по любому из пп.1-26 для лечения атеросклероза, гломерулонефрита, воспалительного заболевания кишечника (болезни Крона), ангиогенеза и заболеваний, характеризую-

щихся образованием новых кровеносных сосудов, включая дегенерацию желтого пятна, диабетическую ретинопатию и диабетическую невропатию, рассеянный склероз, псориаз, возрастную дегенерацию желтого пятна, глазную болезнь Бехчета, увеит, легочную артериальную гипертензию (ЛАГ), включая идиопатическую ЛАГ, наследственную ЛАГ и заболевание, связанное с ЛАГ; хронические воспалительные заболевания, ревматоидный артрит, остеоартрит, немелкоклеточную карциному, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак пищевода, рак яичника, рак молочной железы, солидные опухоли и их метастазы, меланому, гепатоцеллюлярную карциному, ишемическое реперфузионное повреждение, закупорку сосудов, вызванную гемолитической трансфузией при серповидно-клеточной анемии, ишемическое/реперфузионное повреждение, острый инсульт/инфаркт миокарда, закрытую травму головы, посттравматическое воспаление или инсулинорезистентный диабет.

