(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 031129 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2018.11.30

(21) Номер заявки
201492048

(22) Дата подачи заявки
2013.05.08

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

(54) ПОЛИПЕПТИДЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С ХЕМОКИНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ

(31) **61/644,582**
(32) **2012.05.09**
(33) **US**
(43) **2015.04.30**
(86) **PCT/IB2013/053711**
(87) **WO 2013/168108 2013.11.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Браун Зарин, Брэдли Мишелль, Чарлтон Стивен Джон, Ван Хеке Гино Анселмус (GB), Кроуми Карен, Домбрехт Бруно, Стеффенсен Сорен, Баумайстер Юдит, Буше Мари-Поль, Буттон Карло, Бюиз Мари-Анж, Снук Верле, Стеленс Стефани (BE)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2009138519
WO-A1-2011083140
WO-A1-2012062713
ROOVERS R.C. ET AL.: "Nanobodies in therapeutic applications", CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, vol. 9, no. 4, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 327-335, XP009093747, ISSN: 1464-8431 page 330, left-hand column, last paragraph page 331, right-hand column, paragraph 1
ROOVERS ROB C. ET AL.: "A biparatopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 129, no. 8, 15 October 2011 (2011-10-15), pages 2013-2024, XP55086969, ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/ijc.26145 abstract
JÄHNICHEN S. ET AL.: "CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES - PNAS, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 107, no. 47, 23 November 2010 (2010-11-23), pages 20565-20570, XP002611004, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.1012865107 [retrieved on 2010-11-08] abstract
BARNES PETER J.: "New Therapies for Chronic Obstructive Pulmonary Disease", MEDICAL PRINCIPLES AND PRACTICE, vol. 19, no. 5, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 330-338, XP55087012, ISSN: 1011-7571, DOI: 10.1159/000316368 abstract

(57) Настоящее изобретение относится к полипептидам, направленным против хемокинового рецептора CXCR2 или специфически связывающимся с этим рецептором, и, 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 указанные полипептиды, и к применению указанных полипептидов и композиций в лечении заболеваний, связанных с нарушением функции CXCR2.

031129 B1

031129 B1

Настоящее изобретение относится к полипептидам, направленным против хемокинового рецептора CXCR2 или специфически связывающимся с хемокиновым рецептором CXCR2, и, 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 указанные полипептиды, и к применению указанных полипептидов и композиций в лечении 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 прогрессирует и связано с аномальным воспалительным ответом легких на вредные частицы, вызывающие деструкцию паренхимы легких и, тем самым, снижение 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 в развитии ХОБЛ участвуют генетические факторы и факторы окружающей среды, однако одной из самых главных причин развития ХОБЛ является курение на фоне рецидивирующей инфекции легких, приводящее к прогрессирующему снижению функции легких. Прекращение курения замедляет прогрессирование заболевания только на ранней стадии заболевания, но после появления явно выраженных симптомов дает незначительный эффект. С ХОБЛ ассоциируются некоторые сопутствующие патологические состояния, такие как астма, сердечно-сосудистое заболевание, депрессия и мышечная атрофия (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, и поэтому они играют ключевую роль в регуляции хронического воспаления легких при ХОБЛ и его последующего усиления в процессе обострения. Биологическая активность хемокинов IL-8 (CXCL8), GROα (CXCL1) и ENA-78 (CXCL5) опосредуется двумя популяциями рецепторов клеточной поверхности CXCR1 и CXCR2, которые присутствуют на лейкоцитах и многих других клетках организма. Миграция лейкоцитов опосредуется, главным образом, рецептором CXCR2, который связывается с несколькими лигандами, включая IL-8, GROα, β, γ, ENA78 и GCP-2. В противоположность этому CXCR1 селективно активируется IL-8 и в меньшей степени GCP-2. Однако остается неясным, может ли хемотаксис нейтрофилов человека in vivo опосредоваться одним или обоими этими рецепторами.

Аминокислотная последовательность рецептора CXCR2 на 78% гомологична аминокислотной последовательности рецептора CXCR1, и оба эти рецептора присутствуют на нейтрофилах с различными профилями распределения. Экспрессия рецептора CXCR2 на различных клетках и тканях, включая $CD8^{+}$-Т-клетки, природные киллеры (NK), моноциты, тучные клетки, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, клетки гладких мышц и клетки-хозяева, присутствующие в центральной нервной системе, позволяет предположить, что этот рецептор может играть ясно выраженную функциональную роль в развитии системных расстройств и патофизиологии ряда острых и хронических заболеваний. Активация рецептора CXCR2 стимулирует его связывание с белками семейства Gi, связывающимися с гуаниновыми нуклеотидами, что, в свою очередь, стимулирует высвобождение внутриклеточных фосфатов инозита, увеличение уровня внутриклеточного Ca2+ и фосфорилирование внутриклеточных белков под действием ERK1/2-зависимых механизмов, связанное с направленной миграцией клеток по хемокиновому градиенту. После активации рецептор CXCR2 фосфорилируется и быстро интернализуется по аррестин/динаминзависимым механизмам, что приводит к его десенсибилизации. Этот процесс аналогичен процессу, наблюдаемому для многих других GPCR, однако скорость и степень индуцируемой агонистом интернализации CXCR2 выше, чем скорость и степень индуцируемой агонистом интернализации, наблюдаемой в случае CXCR1 (Richardson R.M., Pridgen B.C., Haribabu B., Ali H., Synderman R. 1998. Differential cross-regualtion of the human chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. Evidence for time-dependent signal generation. J. Biol. Chem, 273, 23830-23836).

Длительное время считалось, что IL-8 является медиатором вызываемого нейтрофилами воспаления при ХОБЛ (Keatings V.M. et al., 1996, Differences in IL-8 and tumor necrosis factor-a 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). Биопсия бронхиальных путей, малых дыхательных путей и паренхемы легких у пациентов с ХОБЛ выявила инфильтрацию Т-клеток и повышенное число нейтрофилов, в частности, в просвете 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 в легких пациентов с ХОБЛ увеличивается и коррелирует со степенью тяжести заболевания (Keatings V.M. et al., 1996, Differences in IL-8 and tumor necrosis factor-a 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 уровни TNFα повышаются, что приводит к индуцированию высвобождения IL-8 из эпителиальных клеток дыхательных путей (Keatings). Концентрация GROα в индуцированной

мокроте и в бронхоальвеолярном лаваже (BAL) пациентов с ХОБЛ увеличивается по сравнению с концентрацией GROα у здоровых курильщиков и некурящих (Traves S.L. et al., 2002, Increased levels of the chemokines GROα 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). GROα секретируется альвеолярными макрофагами и эпителиальными клетками дыхательных путей в ответ на стимуляцию TNFα и селективно активирует CXCR2, вызывая хемотаксис нейтрофилов и моноцитов. У пациентов с ХОБЛ наблюдается усиление моноцитарного хемотаксического ответа на GROα, и это может ассоциироваться с повышенным метаболизмом или рециклингом 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 легочная инфекция часто приводит к серьезным обострениям заболевания у пациентов с ХОБЛ, характеризующимся увеличением 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 тяжелыми обострениями ХОБЛ выявила значительное повышение 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 увеличение числа нейтрофилов в мокроте (Bathoorn E., Liesker JJw, Postma D.S. et al, Change in inflammation in outpatient COPD patients from stable phase to a subsequent exacerbation, (2009) Int. J. COPD, 4(1): 101-9), что позволяет предположить, что этот рецептор может играть определенную роль в развитии ХОБЛ и серьезных обострениях этого заболевания. В биоптатах бронхов наблюдается повышенный уровень экспрессии мРНК CXCR2, и этот уровень экспрессии коррелирует с присутствием нейтрофилов в ткани (Qiu 2003). ENA-78 высвобождается, главным образом, из эпителиальных клеток, причем в эпителиальных клетках при обострении ХОБЛ, наблюдается заметное повышение уровня экспрессии ENA-78 (Qiu 2003). Поскольку в дыхательных путях при ХОБЛ наблюдается увеличение концентрации IL-8, GROα и ENA-78, и все эти три лиганда передают сигнал посредством CXCR2, то блокирование этого общего рецептора селективными антагонистами может быть положено в основу разработки эффективной противовоспалительной стратегии лечения такого заболевания.

ХОБЛ развивается медленно и постепенно, и прогрессирование этого заболевания обычно оценивают путем проведения тестов на легочную функцию, таких как спирометрия форсированного объема выдоха (FEV1). Пациенты с предсказанным FEV1 <50%, классифицируются как пациенты с тяжелым заболеванием. Функция легких строго коррелирует с коэффициентом смертности, и почти 35% пациентов с тяжелой ХОБЛ умирает от этого заболевания через 12 лет, тогда как смертность пациентов с легкой или умеренной формой заболевания составляет только 5%. По лидирующим причинам смертности среди населения во всем мире ХОБЛ занимает четвертое место (по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), World Health Report, Geneva, 2000. Available from URL: http://www.who.intwhr/2000/en/whr00_annex_en.pdf), и по существующим прогнозам, число случаев заболевания и смертность от этого заболевания в последующие десятилетия будет только возрастать (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 в последующем, протекающем по спирали ухудшении состояния здоровья больного, и эти обострения в значительной степени ответственны за подавляющее большинство случаев госпитализации больных, страдающих ХОБЛ (BTS (British Thoracic Society), 2006, Burden of Lung Disease Report, 2nd ed, http://www.brit-thoracic.org.Uk/Portals/0/Library/BTS%20Publications/burdeon of lung disease2007.pdf). По оценкам специалистов в области здравоохранения, средние ежегодные показатели по выявлению симптомов составляют 2,3 и по выявлению обострений - 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 необходимого лечения пациенту с обострением, а также более эффективная профилактика этого заболевания позволит снизить нагрузку на стационары, которые постоянно работают в напряженном режиме. Существующие в настоящее время способы лечения ХОБЛ, являются, по существу, паллиативными, и пока не существует какой-либо эффективной терапии, которая позволит предотвращать ухудшение функции легких или прогрессирующую деструкцию дыхательных путей, ассоциированных с указанным заболеванием. В настоящее время для устранения симптомов и лечения обострений заболевания применяются такие лекарственные средства, как β-адренергические бронходилататоры кратковременного и пролонгированного действия, антихолинергические средства, вводимые путем ингаляции (мускариновые антагонисты), и кортикостероиды, также вводимые путем ингаляции. Главным недостатком современной терапии с применением кортикостероидов является то, что такая терапия становится неэффективной из-за вырабатывания у пациентов резистентности к кортикостероидам, которая приводит к инактивации противовоспалительного действия этих лекарственных средств. Совершенно очевидно, что современная медицина остро нуждается в новых лекарственных средствах, которые смогут предупреждать прогрессирование ХОБЛ. Антагонисты хемокиновых рецепторов являются привлекательным средством для использования в терапии, поскольку транспорт воспалительных клеток при ХОБЛ управляется множеством хемокинов, и поэтому блокада

хемокиновых рецепторов низкомолекулярными (LMW) антагонистами может служить эффективной противовоспалительной стратегией лечения данного заболевания. Главным отличительным признаком ХОБЛ является усиление воспалительного ответа, наблюдаемое у здоровых курильщиков, и поэтому целью такой терапии является не полное подавление инфильтрации воспалительных клеток, а только снижение их числа до уровней, наблюдаемых у здоровых курильщиков без ХОБЛ. Специфическое действие анти-CXCR2 антител даст возможность избежать подавления общего иммунного ответа, ассоциированного с действием стероидов, и обеспечить сохранение активности CXCR1, что будет приводить к активации базальных нейтрофилов, играющих важную роль в защите хозяина от ХОБЛ и КФ. В настоящее время большинство лекарственных средств для лечения ХОБЛ вводятся путем ингаляции в целях снижения системных побочных эффектов, однако поскольку хемокиновые антагонисты действуют на рецепторы, экспрессируемые в воспалительных клетках кровотока, то их системное введение может оказаться оптимальным. Этот способ может оказаться эффективным для доставки таких средств в малые дыхательные пути и в паренхиму легких, которые поражаются при ХОБЛ.

Хемокиновые рецепторы в отличие от цитокиновых и интерлейкиновых рецепторов принадлежат к суперсемейству рецепторов 7TM-GPCR, продуцирующих сильный "лекарственный" эффект. Несмотря на это, предпринятые ранее попытки обнаружения сильных антагонистов столкнулись с более серьезными трудностями, чем это ожидалось, исходя из опыта работы с рецепторами GPCR, имеющими небольшие пептиды или биогенные аминовые лиганды. Попытки разработать программы обнаружения низкомолекулярных лекарственных средств, направленные на выявление антагонистов хемокиновых рецепторов, привели к лучшему пониманию идиосинкразии хемокиновых рецепторов и структурных элементов, необходимых для действия малых молекул в качестве антагонистов. Интересно отметить, что структурное разнообразие антагонистов CC-хемокиновых рецепторов, представленное рядом фундаментально отличающихся друг от друга идентифицированных групп химических соединений, значительно превышает структурное разнообразие антагонистов CXC-хемокиновых рецепторов, что позволяет предположить, что относительные трудности в выявлении антагонистов могут заключаться в различии между рецепторами этих двух классов.

В общих чертах было подтверждено, что хемокиновые рецепторы являются труднодоступными мишенями для ингибирования, и были предприняты огромные усилия для идентификации эффективных и селективных антагонистов CXCR2. Низкомолекулярный антагонист CXCR2 был впервые описан в 1998, и после этого был разработан ряд неконкурентных аллостерических антагонистов CXCR2, некоторые из которых в настоящее время проходят клинические испытания. Тем не менее, совершенно очевидно, что необходимо разработать еще более сильные и эффективные 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 рекомбинантными методами сулит огромные перспективы в разработке в высокой степени селективных способов 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 обсуждены ниже в разделах настоящего описания, относящихся к полипептидам, сконструированным так, чтобы они были направлены, по меньшей мере, против двух эпитопов CXCR2.

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

Другой задачей настоящего изобретения является разработка способа лечения или предупреждения ХОБЛ и других заболеваний, связанных с нарушением функции CXCR2, где указанным способом является иммунотерапия.

Еще одной задачей настоящего изобретения является получение полипептида, содержащего CDR иммуноглобулина, где указанный полипептид представляет собой антагонист передачи сигнала CXCR2.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему два антигенсвязывающих домена иммуноглобулина, где указанный полипептид направлен против хемокинового рецептора CXCR2 или связывается с этим рецептором, и где указанный первый антигенсвязывающий домен содержится в первом V_{HH}-домене или в его фрагменте, происходящем от одной тяжелой цепи верблюжьего антитела, или представляет собой оптимизированную последовательность, включая ее гуманизированный вариант, и указанный второй антигенсвязывающий домен содержится во втором V_{HH}-домене или в его фрагменте, происходящем от одной тяжелой цепи верблюжьего антитела, или представляет собой оптимизированную последовательность, включая ее гуманизированный вариант, и где С-конец указанного полипептида содержит удлинение в последовательности антигенсвязывающих доменов по меньшей мере на один дополнительный аминокислотный остаток, и где первый антигенсвязывающий домен распознает первый эпитоп на CXCR2, и второй антигенсвязывающий домен распознает второй эпитоп на CXCR2. Предпочтительный полипептид по изобретению содержит первый антигенсвязывающий домен, который обладает

способностью связываться с линейным пептидом, состоящим из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, и второй антигенсвязывающий домен, который либо не обладает способностью связываться с указанным линейным пептидом, либо связывается с этим пептидом с более низкой аффинностью. SEQ ID NO: 7 представляет собой первые 19 N-концевых аминокислот CXCR2 человека. Предпочтительный полипептид по изобретению является бипаратопным. Используемый в данном описании термин "бипаратопный" означает, что полипептид содержит два антигенсвязывающих домена, распознающих два различных эпитопа на одном и том же белке-мишени. Однако в объем настоящего изобретения входят также полипептиды, которые являются мультипаратопными, то есть содержат антигенсвязывающие домены, распознающие три, четыре или более эпитопов на одном и том же белке-мишени, поскольку такие полипептиды представляют собой би- или мультипаратопные и поливалентные полипептиды, то есть полипептиды, которые также имеют антигенсвязывающие домены, распознающие один или несколько других белков-мишеней.

В предпочтительных полипептидах 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 в настоящем описании, указанный линкер может происходить, а может и не происходить от иммуноглобулина, но предпочтительно такой линкер представляет собой пептид.

Один вариабельный домен иммуноглобулина, имеющий аминокислотную последовательность V_{HH}, или ее фрагмент, или вариант, происходящий только от тяжелой цепи верблюжьего антитела, может в качестве альтернативы называться в данном описании "V_{HH}-доменом", или его фрагментом, или "нанотелом". При этом следует отметить, что нанотело (Nanobody®), нанотела (Nanobodies®) и наноклон (Nanoclone®) зарегистрированы под торговыми знаками фирмы Ablynx N.V.

В полипептидах по изобретению каждый антигенсвязывающий домен содержит по меньшей мере одну CDR, определенную в настоящем описании, и предпочтительно две или три CDR. В предпочтительных полипептидах по изобретению предпочтительным структурным элементом одного вариабельного домена иммуноглобулина является V_{HH}-домен или нанотело, которые имеют структуру

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

где CDR и FR являются такими, как определено в настоящем описании.

Предпочтительные бипаратопные нанотела по изобретению имеют одну из нижеследующих структур:

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

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

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

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

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; и где HLE представляет собой связывающую единицу, способствующую увеличению времени полужизни in vivo, и EXT представляет собой С-концевое удлинение по меньшей мере на один дополнительный аминокислотный остаток.

Объем настоящего изобретения охватывает фрагменты или варианты предпочтительного бипаратопного нанотела, описанного выше, включая варианты, где CDR и FR происходят от верблюжьего антитела, или варианты, где одна или более FR имеют по меньшей мере одну гуманизирующую замену и предпочтительно являются полностью гуманизированными.

Особенно предпочтительными бипаратопными нанотелами по изобретению являются нанотела, обозначенные в данном описании как 163D2/127D1, 163E3/127D1, 163E3/54B12, 163D2/54B12, 2B2/163E3, 2B2/163D2, 97A9/2B2 и 97A9/54B12, которые имеют дополнительное С-концевое удлинение по меньшей мере на один дополнительный аминокислотный остаток, и аминокислотные последовательности которых представлены в табл. 13 и, в частности, представлены их варианты, где FR включают описанные в данном описании последовательность-оптимизирующие аминокислотные замены, такие как замены, указанные для компонентов нанотел в табл. 32.

Другими особенно предпочтительными бипаратопными нанотелами по изобретению являются нанотела, указанные в табл. 33, которые имеют С-концевое удлинение, содержащее по меньшей мере один

дополнительный аминокислотный остаток.

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, присутствующим во внешних петлях CXCR2 человека (аминокислотные остатки 106-120, 184-208 и 274-294 SEQ ID NO: 1). В одном из вариантов осуществления изобретения указанный эпитоп является конформационным. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный эпитоп содержит аминокислотные остатки W112, G115, I282 и T285 SEQ ID NO: 1.

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

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим полипептид по изобретению в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или эксципиентом. Поскольку полипептиды по изобретению могут 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, гангренозная пиодермия, возрастная дегенерация желтого пятна, глазная болезнь Бехчета, увеит, немелкоклеточная карцинома, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак пищевода, меланома, гепатоцеллюлярная карцинома или ишемическое реперфузионное поражение. Такими заболеваниями могут быть также заболевания дыхательных путей, такие как кистозный фиброз, астма, астма в тяжелой форме, обострения астмы, аллергическая астма, нейтрофильная астма, острое поражение легких, острый дистресс-синдром дыхательных путей, идиопатический фиброз легких, ремоделирование дыхательных путей, синдром облитерирующего бронхиолита или бронхопульмонарная дисплазия.

В одном из вариантов осуществления изобретения полипептиды по изобретению могут быть использованы для лечения астмы и, в частности, астмы в тяжелой форме и обострений астмы.

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения полипептиды по изобретению могут быть использованы для лечения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) или обострений ХОБЛ, которые характеризуются миграцией лейкоцитов, в частности нейтрофилов в паренхиму легких с последующей ее деструкцией, где такая миграция опосредуется передачей CXCR2-сигнала. Способность полипептидов по изобретению блокировать, ингибировать или снижать активность CXCR2 делает их превосходными кандидатами на лекарственные средства, которые могут быть применены в целях предупреждения или лечения этого заболевания.

Для лечения человека предпочтительно, чтобы полипептид по изобретению был направлен против CXCR2 человека или специфически связывался с ним. Однако предпочтительно, чтобы указанный полипептид мог перекрестно реагировать с CXCR2 приматов и, в частности, с CXCR2 собакоподобных обезьян, что позволит проводить соответствующие тесты на токсичность на указанных обезьянах. Полипептиды по изобретению, если предусматривается их применение в ветеринарии, могут быть направлены против гомологов CXCR2, либо они могут специфически связываться с указанными гомологами, происходящими от других видов.

Другие аспекты изобретения будут более очевидны из подробного обсуждения настоящего изобретения, представленного ниже.

Описание фигур

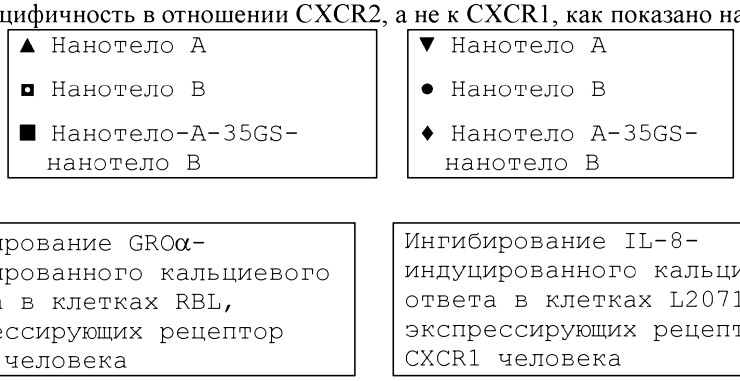
На фиг. 1 представлены кривые ответов, построенные исходя из способности двух нанотел и бипаратопного нанотела по изобретению блокировать высвобождение [^{35}S]GTPγS из мембран CHO-CXCR2, стимулированных агонистом Gro-α, где указанная способность была измерена при возрастающих концентрациях нанотела.

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

На фиг. 2 проиллюстрирована активность и эффективность двух репрезентативных нанотел 127D1 (фиг. 2a), 163E3 (фиг. 2b) и бипаратопного нанотела 163E-35GS-127D1 (фиг. 2c), определенные по ингибированию GRO-α как % ингибирования в зависимости от концентрации нанотела при различных концентрациях GRO-α. Показано, что нанотело 127D1 является активным, но не эффективным, тогда как нанотело 163E3 обладает меньшей активностью, но большей эффективностью, чем 127D1. Очевидно, что при объединении этих двух связывающих молекул, полученная бипаратопная связывающая молекула

является активной и эффективной.

На фиг. 3 представлен результат анализа репрезентативного полипептида по изобретению на преимущественную специфичность в отношении CXCR2, а не к CXCR1, как показано на панелях ниже.



Очищенные протестированные моновалентное анти-CXCR2 (A или B) или бипаратопные нанотела показывали активность в отношении hCXCR2 при концентрациях нМ в ответ на GROα, и в отношении рецептора hCXCR1 показывали активность при концентрациях мкМ в ответ на IL-8-индуцированное высвобождение внутриклеточного кальция.

На фиг. 4 показано, что бипаратопное нанотело с пролонгированным временем полужизни, содержащее C-концевое удлинение аминокислот 79-76-Alb8-AA, значительно снижало реактивность анти-Nb IgG с 50 до 20% у мужчин и с 61 до 16% у женщин. Кроме того, C-концевые варианты с Ala-Ala, а именно, 79-76-Alb8-AA и 79-86-Alb8-AA, не влияли на функциональную активность в отличие от нанотел без C-концевых удлинений, 79-76-Alb8 и 79-86-Alb8.

На фиг. 5 проиллюстрировано влияние анти-CXCR2 нанотела, 79-76-Alb8-AA, на хемотаксис первичных нейтрофилов человека к rhGRO-α. Выделенные первичные нейтрофилы человека, меченные кальцеином-AM, были предварительно инкубированы с различными концентрациями анти-CXCR2 нанотела, 79-76-Alb8-AA (•), в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем эти клетки добавляли к 3 мкм-вставке в многолуночном планшете и оставляли в планшете-приемнике на 90 мин при 37°C для хемотаксиса к 2 нМ rhGRO-α. Флуоресценцию клеток, которые мигрировали в лунки планшета-приемника, измеряли на планшет-ридере BioTek Synergy при возбуждении на длине волны 485 нм и излучении на длине волны 520 нм. Нанотело 79-76-Alb8-AA ингибировало rhGROα-стимулированный хемотаксис при величине IC_{50}=0,256±0,02 нМ (среднее±ср.кв.ош., n=4 донора).

Определения.

В настоящем описании, а также в примерах и в формуле изобретения:

a) если не указано или не определено иное, все используемые в данном описании термины имеют свои общепринятые значения, понятные специалистам в данной области. Далее приводится, например, перечень стандартных руководств, цитируемых 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); и Janeway et al., "Immunobiology" (6th Ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York (2005);

b) если не указано иное, используемый в данном описании термин "иммуноглобулин" или "последовательность иммуноглобулина" независимо от того, употребляется ли он в отношении антитела с тяжелой цепью или стандартного 4-цепочечного антитела, является общим термином, который включает полноразмерное антитело, его отдельные цепи, а также все их 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 данном описании термин "последовательность" (например, в таких словосочетаниях, как "последовательность иммуноглобулина", "последовательность антитела", "последовательность вариабельного домена", "последовательность V_{HH}" или "последовательность белка"), в своем общепринятом значении, включает релевантную аминокислотную последовательность, а также последовательности нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности, кодирующие такую аминокислотную последовательность, если только в контексте описания изобретения не требуется более точное определение;

c) если не указано иное, используемый в данном описании термин "один вариабельный домен иммуноглобулина" является общим термином, который включает, но не ограничивается ими, антигенсвязывающие домены или их фрагменты, такие как V_{HH}-домены или V_H- или V_L-домены соответственно. Используемые в данном описании термины "антигенсвязывающие молекулы" или "антигенсвязывающие белки" являются синонимами, а также включают понятие "нанотела". Отдельные вариабельные домены

иммуноглобулина также представляют собой последовательности вариабельного домена легкой цепи (например, V_L-последовательность) или последовательности вариабельного домена тяжелой цепи (например, V_H-последовательность), и 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 являются подходящими для их применения в качестве доменных антител, то есть однодоменных антител; или последовательности иммуноглобулина, которые являются подходящими для их применения в качестве однодоменных антител, то есть dAb; или последовательности иммуноглобулина, которые являются подходящими для их применения в качестве dAb или нанотела, включая, но не ограничиваясь ими, последовательности V_{HH}. Настоящее изобретение охватывает последовательности иммуноглобулина различного происхождения, включая последовательности мышиных, крысиных, кроличьих, ослиных, человеческих и верблюжьих иммуноглобулинов. Один вариабельный домен иммуноглобулина включает полностью человеческие, гуманизированные и другие оптимизированные последовательности или химерные последовательности иммуноглобулина. Один вариабельный домен иммуноглобулина и его структура могут рассматриваться, но не ограничиваясь ими, как состоящие из четырех каркасных областей "FR", которые известны специалистам в данной области и описаны в данном описании 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 или "CDR", которые известны специалистам в данной области как "гипервариабельная область 1" или "CDR1"; "гипервариабельная область 2" или "CDR2" и "гипервариабельная область 3" или "CDR3" соответственно;

d) если не указано иное, все методы, стадии, технологии и модификации, которые подробно и конкретно не описаны в настоящем описании, могут быть осуществлены и были осуществлены способами, известными per se и будут понятны для специалиста в данной области. В этой связи, можно обратиться, например, к указанным ниже стандартным руководствам и к цитируемым в них работам, например к следующим 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, где описаны методы конструирования белков, такие как созревание аффинности, и другие методы повышения специфичности и улучшения других нужных свойств белков, таких как иммуно глобулины;

e) аминокислотные остатки указаны стандартным трехбуквенным или однобуквенным кодом, принятым для обозначения аминокислот;

f) для сравнения двух или более нуклеотидных последовательностей процент "идентичности" первой нуклеотидной последовательности и второй нуклеотидной последовательности может быть вычислен или определен путем деления [числа нуклеотидов в первой аминокислотной последовательности, идентичных нуклеотидам в соответствующих положениях во второй нуклеотидной последовательности] на [общее число нуклеотидов в первой нуклеотидной последовательности] и умножения полученного результата на [100%], где каждая делеция, инсерция и замена или каждое добавление нуклеотида во второй нуклеотидной последовательности, сравниваемой с первой нуклеотидной последовательностью, рассматриваются как различие в одном нуклеотиде (в одном 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 помощью 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 нуклеотидная последовательность с наибольшим числом нуклеотидов может быть взята как "первая" нуклеотидная последовательность, и другая нуклеотидная последовательность может быть взята как "вторая" нуклеотидная последовательность;

g) для сравнения двух или более аминокислотных последовательностей процент "идентичности" первой аминокислотной последовательности и второй аминокислотной последовательности (также называемый в данном описании "идентичностью аминокислотных последовательностей") может быть вычислен или определен путем деления [числа аминокислотных остатков в первой аминокислотной последовательности, идентичных аминокислотным остаткам в соответствующих положениях второй аминокислотной последовательности] на [общее число аминокислотных остатков в первой аминокислотной последовательности] и умножения полученного результата на [100%], где каждая делеция, инсерция и замена или каждое добавление аминокислотного остатка во второй аминокислотной последовательности, сравниваемой с первой аминокислотной последовательностью, рассматриваются как различие в одном аминокислотном остатке (в одном положении), то есть как "различие аминокислот", определяемое в настоя-

щем описании; 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, аминокислотная последовательность с наибольшим числом аминокислотных остатков может быть взята как "первая" аминокислотная последовательность, и другая аминокислотная последовательность может быть взята как "вторая" аминокислотная последовательность.

Также для определения степени идентичности двух аминокислотных последовательностей специалист в данной области может учитывать так называемые "консервативные" аминокислотные замены, описанные ниже в пункте v).

Любые аминокислотные замены в описанных в данном описании полипептидах могут быть также сделаны исходя из анализа частоты различий в аминокислотах гомологичных белков, происходящих от различных видов, разработанного Schulz et al., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1978, анализа структурообразующих потенциалов, разработанного Chou and Fasman, Biochemistry 13: 211, 1974 and Adv. Enzymol., 47: 45-149, 1978, и анализа характера гидрофобности белков, разработанного Eisenberg et al., Proc. Nad. 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, где все указанные публикации во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством 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 подразумевается, что две аминокислотные последовательности могут иметь различия в одной, двух или более указанных аминокислотах;

i) 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 указанную нуклеотидную последовательность или аминокислотную последовательность, соответственно, но обычно это означает, что первая указанная нуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность включает 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 продуцирования или получения первой указанной последовательности (где указанным способом может быть, например, любой подходящий описанный в данном описании 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 указанной аминокислотной последовательности (другими словами, предпочтительно, чтобы первая указанная аминокислотная последовательность, а также 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 указанных 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 указанной более крупной нуклеотидной последовательностью);

j) 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 выделе-

на, - 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 "по существу, выделенной", если степень ее чистоты выше по меньшей мере в 2 раза и, 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 "по существу, 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;

k) используемый в данном описании термин "антигенсвязывающий домен" означает аминокислотную последовательность иммуноглобулина, содержащую по меньшей мере одну CDR и имеющую конформацию, распознающую мишень, а именно антигенную детерминанту или эпитоп;

l) используемые в данном описании 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;

m) полипептид по изобретению, такой как, например, описанное в данном описании 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), рассматривается как полипептид, направленный "против" или направленный "непосредственно против" указанной антигенной детерминанты, указанного эпитопа, антигена или белка;

n) 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 авидности, как указано на стр. 53-56 заявки WO 08/020079 (которая включена в настоящее описание посредством 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 и более предпочтительно 10^{-8}-10^{-12} моль/л (то есть с константой ассоциации (K_A) 10^5-10^{12} л/моль или более, предпочтительно 10^7-10^{12} л/моль или более и 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 M^{-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 в данной области per se, а также другие приведенные в данном описании методы. Как очевидно для специалиста в данной области 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 в данной области и включают, например, методы, описанные на стр. 53-56 заявки WO 08/020079;

o) время полужизни полипептида по изобретению и, 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 в данной области, и, по существу, описаны, например, в параграфе o) на стр. 57 заявки WO 08/020079. Как приведено на стр. 57 заявки WO 08/020079, время полужизни может быть выражено такими параметрами, как $t_{1/2}$-альфа, $t_{1/2}$-бета 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 и Peters et al., Pharmacokinete 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 $t_{1/2}$-бета с увеличением или без увеличения $t_{1/2}$-альфа и/или AUC или того и друго-

го;

p) 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, авидности, специфичности и/или селективности CXCR2 в отношении одного или более его лиганда или партнера по связыванию и/или снижение чувствительности CXCR2 для одного или более условий в среде или в окружении, в которых 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 данном описании термин "модуляция" может означать аллостерическую модуляцию CXCR2; и/или снижение уровня связывания или ингибирование связывания CXCR2 с одним из его лигандов и/или конкуренция 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 и, 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;

r) полипептид по изобретению считается "специфичным" в отношении 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 и 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 и 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;

s) используемые в данном описании термины "перекрестно блокировать", "перекрестно блокированный" и "перекрестное блокирование" являются синонимами и относятся к способности одного вариабельного домена иммуноглобулина или полипептида негативно влиять на связывание других отдельных вариабельных доменов иммуноглобулина или полипептидов по изобретению с данной мишенью. Степень влияния одного вариабельного 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 вариабельного 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 вариабельный 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 данном описании отдельные вариабельные 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 вариабельного 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_{HH}, dAb или аналогичного варианта V_H/V_L);

t) 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) в отношении этих различных антигенов или антигенных детерминантов;

u) определенный в данном 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 в данной области 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 цитируемых там ссылках.

Такими консервативными заменами предпочтительно являются замены, где одна аминокислота, входящая в нижеследующие группы (a)-(e), заменена другим аминокислотным остатком, принадлежащим к той же самой группе, где указанными группами являются: (a) небольшие алифатические неполярные или слабополярные остатки: Ala, Ser, Thr, Pro и Gly; (b) полярные отрицательно заряженные остатки и их (незаряженные) амиды: Asp, Asn, Glu и Gln; (c) полярные, положительно заряженные остатки: His, Arg и Lys; (d) крупные алифатические неполярные остатки: Met, Leu, Ile, Val и Cys и (e) 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 Ile или на Leu;

v) используемая в данном 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 более другими CDR, определяют комплементарность с антигеном(ами) или эпитопом(ами), которые распознают полипептид по изобретению. CDR идентифицируют в аминокислотных последовательностях в соответствии с определенными соглашениями о нумерации. В формуле изобретения и в конкретном описании настоящего изобретения используется нумерация по Кабату;

w) используемый в данном описании термин "FR" означает каркасную область (иногда обозначаемую FW). Каркасные области представляют собой аминокислотные фрагменты, которые фланкируют одну или более CDR и сохраняют их правильную трехмерную конформацию, необходимую для распознавания антигена или эпитопа. FR не обладают специфичностью в отношении антигена или эпитопа 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 данном описании 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 данном описании термин "CXCR2", по существу, означает любой белок, обладающий функцией CXCR2, независимо от источника его происхождения. Однако используемый в данном описании термин "CXCR2 человека" означает белок, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или любой его аллельный вариант или ортолог, и термин "CXCR2 собакоподобных обезьян" означает белок, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, или любой его аллельный вариант или ортолог;

y) используемый в данном 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, инсерции или делеции 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 и, в частности, бипаратопных нанотел по изобретению, описаны в заявке WO 2009/095235, которая включена в настоящее описание посредством ссылки. Методы оптимизации последовательностей могут быть также осуществлены в целях гуманизации бипаратопного полипептида по изобретению описанным в данном описании способом. Таким образом, при употреблении любого из терминов "оптимизация последовательно-

стей", "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 и предпочтительно к бипаратопным нанотелам;

z) используемый в данном описании термин "С-концевое удлинение" означает аминокислотные остатки, которые были присоединены к С-концу полипептидной цепи. Такое удлинение имеет длину по меньшей мере в один и предпочтительно по меньшей мере два аминокислотных остатка, и его функция заключается в маскировке эпитопа, который в той или иной степени взаимодействует с молекулами IgG, присутствующими в сыворотке некоторых индивидуумов.

Подробное описание изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему два антигенсвязывающих домена иммуноглобулина, где указанный полипептид направлен против хемокинового рецептора CXCR2 или связывается с этим рецептором, и где указанный первый антигенсвязывающий домен содержится в первом V_{HH}-домене или в его фрагменте, происходящем от одной тяжелой цепи верблюжьего антитела, или представляет собой оптимизированную последовательность, включая ее гуманизированный вариант, и указанный второй антигенсвязывающий домен содержится во втором V_{HH}-домене или в его фрагменте, происходящем от одной тяжелой цепи верблюжьего антитела, или представляет собой оптимизированную последовательность, включая ее гуманизированный вариант, где С-конец указанного полипептида имеет удлинение в последовательности антигенсвязывающих доменов по меньшей мере на один дополнительный аминокислотный остаток, и где первый антигенсвязывающий домен распознает первый эпитоп на CXCR2, и второй антигенсвязывающий домен распознает второй эпитоп на CXCR2.

Следует отметить, что все описанные в данном описании варианты осуществления изобретения включают С-концевое удлинение в антигенсвязывающем домене, приведенное выше, независимо от того, обсуждается ли такое удлинение для какого-либо данного варианта осуществления или нет. Таким образом, все полипептиды по изобретению имеют такое С-концевое удлинение.

Предпочтительный полипептид по изобретению содержит первый антигенсвязывающий домен, который обладает способностью связываться с линейным пептидом, состоящим из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, и второй антигенсвязывающий домен, который либо не обладает способностью связываться с указанным линейным пептидом, либо связывается с этим пептидом с более низкой 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, и указанный второй антигенсвязывающий домен распознает второй эпитоп на CXCR2, находящийся за пределами аминокислот 1-19.

Вариабельная 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 вариабельных доменов можно найти в предшествующем описании WO 08/020079 на стр. 59 и в 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, обладающие такими же в высокой степени предпочтительными свойствами, 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 отсутствии вариабельного домена легкой цепи или без какого-либо взаимодействия с этим доменом), и нанотела могут функционировать как одна относительно небольшая функциональная антигенсвязывающая структурная единица, домен или белок. Используемый в данном описании термин "нанотело" охватывает не только природные V_{HH}-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 присутствует в первом нанотеле, и указанный второй антигенсвязывающий домен присутствует во втором нанотеле, и где указанные первое и второе нанотела связаны посредством линкера.

Структура V_{HH}-домена может быть представлена как

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

и бипаратопный полипептид по изобретению может иметь одну из следующих структур:

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

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

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

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

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; и где HLE представляет собой связывающую единицу, способствующую увеличению времени полужизни in vivo, и EXT представляет собой С-концевое удлинение по меньшей мере на один дополнительный аминокислотный остаток.

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

Однако бипаратопные нанотела по изобретению могут включать только 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 следующих комбинаций в С-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 включать 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 более FR имеют по меньшей мере одну последовательность-оптимизирующую аминокислотную замену, при этом предпочтительно, чтобы одна или более и предпочтительно все FR были частично или полностью гуманизированными. Замены для оптимизации последовательности более подробно обсуждаются ниже.

Как также указано в настоящем описании, в тех вариантах осуществления изобретения, в которых первый и второй антигенсвязывающие домены находятся в отдельных вариабельных доменах первого и второго иммуноглобулина, не являющихся нанотелами, и в доменах или фрагментах стандартных антител, как обсуждено выше, например антител человека, доменов или фрагментов, область(и) CDR может(гут) быть модифицирована(ы) путем введения в нее(их) по меньшей мере одной замены верблюжьим остатком и продуцировать, но необязательно, полностью верблюжьи CDR.

Кроме того, как описано в настоящем описании, общее число аминокислотных остатков в одном нанотеле может составлять в пределах 110-120 остатков, предпочтительно 112-115 остатков и 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 данном описании требованиям и могут также оказаться предпочтительными для достижения описанных в данном описании целей.

Кроме того, как описано в настоящем описании, аминокислотные остатки нанотела пронумерованы в соответствии с общей системой нумерации V_H-доменов, предложенной Кабатом и др. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91) и применяемой к верблюжьим V_{HH}-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 положениях 103-113. В предпочтительном бипаратопном нанотеле по изобретению N-концевое нанотело может иметь FR и CDR в положениях, указанных выше, и в С-концевом нанотеле FR5 нанотела может содержать аминокислотные остатки в положениях 1-30; CDR4 нанотела может содержать аминокислотные остатки в положениях 31-35; FR6 нанотела может содержать аминокислотные остатки в положениях 36-49; CDR5 нанотела может содержать аминокислотные остатки в положениях 50-65; FR7 нанотела может содержать аминокислотные остатки в положениях 66-94; CDR6 нанотела может содержать аминокислотные остатки в положениях 95-102; и FR8 нанотела может содержать аминокис-

лотные остатки в положениях 103-113.

Однако следует отметить, что CDR и FR в антителе и, в частности, в нанотеле могут быть идентифицированы в соответствии с системами нумерации, которые являются альтернативой системе Кабата. Такими системами являются системы нумерации по Чотия, системы нумерации IMGT и AHo. Идентификация положений CDR или FR любой одной из аминокислотных последовательностей, указанных в табл. 9, 13, 19, 32, 33 и 34 и пронумерованных в соответствии с этими альтернативными системами нумерации, может быть осуществлена с помощью анализа последовательностей. Для этого можно обратиться к следующим web-сайтам: http://www.biochem.uci.ac.uk/-martin/ (Chothia); http://imqt.cines.fr (IMGT) и http://www.bio.uzh.ch/antibody/index.html (AHo). В частности, в предпочтительных описанных в данном описании бипаратопных нанотелах по изобретению CDR 1, 2, 3, 4, 5 или 6 могут быть определены в соответствии с одной из этих систем нумерации, которые являются альтернативой системе нумерации Кабата, но которые все же входят в объем настоящего изобретения.

CDR по Чотия для некоторых нанотел по изобретению представлены в табл. 35.

Нанотела могут принадлежать к так называемому "классу V_H3" (то есть к классу нанотел, имеющих последовательности, в высокой степени гомологичные последовательностям зародышевой линии класса V_H3 человека, таких как DP-47, DP-51 или DP-29), где указанные нанотела являются предпочтительными для конструирования бипаратопных нанотел по изобретению. Однако следует отметить, что нанотело любого типа, направленное против CXCR2, и, например, нанотела, принадлежащие к так называемому "классу V_H4" (то есть к классу нанотел, имеющих последовательности, в высокой степени гомологичные последовательностям зародышевой линии класса V_H4 человека, таких как DP-78), а также нанотела, описанные, например, в WO 07/118670, могут быть также использованы для конструирования бипаратопных нанотел по изобретению.

Линкерная молекула, которая соединяет один или более пептидов или полипептидов, содержащих первый и второй антигенсвязывающие домены по изобретению, может происходить, а может и не происходить от иммуноглобулина. Если полипептидом по изобретению является один вариабельный домен бипаратопного иммуноглобулина, например нанотела, то линкер соединяет С-конец одного вариабельного домена одного иммуноглобулина, содержащего антигенсвязывающий домен, с N-концом одного вариабельного домена другого иммуноглобулина, содержащего антигенсвязывающий домен.

Подходящие спейсеры или линкеры, используемые в бипаратопных полипептидах по изобретению для связывания первого и второго антигенсвязывающих доменов и, в частности, двух нанотел, известны специалистам в данной области, и ими могут быть, в основном, любой линкер или спейсер, используемый для связывания аминокислотных последовательностей. При этом предпочтительно, чтобы указанный линкер или спейсер был пригоден для конструирования белков или полипептидов, применяемых в фармацевтике.

Так, например, линкером может быть подходящая аминокислотная последовательность и, в частности, аминокислотные последовательности, состоящие из 1-50, предпочтительно 1-30, например 1-10 аминокислотных остатков. Некоторыми предпочтительными примерами таких аминокислотных последовательностей являются линкеры gly-ser, например линкеры типа $(gly_xser_y)_z$, такие как, например, $(gly_4ser)_3$ или $(gly_3ser_2)_3$, описанные в WO 99/42077, и линкеры GS30, GS15, GS9 и GS7, описанные в приведенных в данном описании заявках Ablynx (см., например, WO 06/040153 и WO 06/122825), а также области, подобные шарнирным областям, такие как шарнирные области природных антител с тяжелыми цепями или аналогичные последовательности (такие как последовательности, описанные в WO 94/04678). Некоторые другие линкеры могут представлять собой полиаланиновые линкеры (такие как AAA), а также линкеры GS30 (SEQ ID NO:85 в WO 06/122825) и GS9 (SEQ ID NO:84 в WO 06/122825).

Предпочтительными линкерами по изобретению являются пептидные линкеры, имеющие длину от 3 до 50 аминокислот, например линкеры длиной 3-9, 10-15, 16-20, 21-25, 26-35, 36-40, 41-45 или 46-50 аминокислот. В одном из вариантов осуществления изобретения пептидный линкер имеет длину в 35 аминокислот. Линкер может состоять только из двух различных аминокислот. Как указано выше, такими линкерами могут быть глицин и серин. Альтернативно, такими линкерами могут быть пролин и серин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения и, в частности, в бипаратопных нанотелах по изобретению, пептидный линкер состоит из аминокислотной последовательности GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 220).

Другие подходящие линкеры обычно включают органические соединения или полимеры и, в частности, соединения или полимеры, пригодные для белков, которые могут быть использованы в фармацевтических целях. Так, например, полиэтиленгликолевые молекулы были использованы для связывания доменов антител, см., например, WO 04/081026.

Таким образом, в другом аспекте настоящее изобретение относится к молекуле, содержащей по меньшей мере два полипептида, где указанная молекула направлена против хемокинового рецептора CXCR2 или связывается с этим рецептором, и где первый полипептид содержит первый антигенсвязывающий домен иммуноглобулина, и 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 не-

пептидного линкера.

Предпочтительно в одном из аспектов изобретения первый антигенсвязывающий домен способен связываться с линейным пептидом, состоящим из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, и 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, и второй эпитоп находится за пределами аминокислот 1-19 CXCR2.

Предпочтительно в этом аспекте изобретения первый и второй антигенсвязывающие домены содержатся в отдельных вариабельных доменах иммуноглобулина, где указанные первый и второй отдельные вариабельные домены иммуноглобулина, предпочтительно представляют собой нанотела и, в частности, любое из нанотел, конкретно описанных в настоящем описании.

Во всех описанных в данном описании 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(ут) также сообщать полипептидам по изобретению одно или несколько других благоприятных свойств или функций, и/или вводить один или более сайтов для образования производных и/или для присоединения функциональных групп (например, как описано в настоящем описании для производных бипаратопных нанотел по изобретению). Так, например, линкеры, содержащие один или более заряженных аминокислотных остатков (см. табл. A-2 на стр. 48 международной заявки WO 08/020079), могут сообщать улучшенные гидрофильные свойства, и 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 настоящего изобретения специалист может самостоятельно выбрать оптимальные линкеры, подходящие для использования в конкретном полипептиде по изобретению после проведения, но необязательно, небольшого числа нетрудоемких рутинных экспериментов.

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 настоящего изобретения специалист в данной области может самостоятельно выбрать оптимальные линкеры, подходящие для использования в конкретном полипептиде по изобретению после проведения, но необязательно, небольшого числа нетрудоемких рутинных экспериментов.

Неожиданно было обнаружено, что сыворотка некоторых индивидуумов содержит молекулы IgG, которые могут взаимодействовать с анти-CXCR2 нанотелами по изобретению, хотя эти индивидуумы ранее не подвергались контакту с нанотелами. Было обнаружено, что в результате взаимодействия молекул IgG с конформационным эпитопом в гуманизированном Vh-домене, область обычно маскируется в антителах CH1-доменом. Для решения этой проблемы, авторами настоящего изобретения были получены бипаратопные нанотела, которые являются специфичными в отношении CXCR2 и включают С-концевое удлинение. Было обнаружено, что это С-концевое удлинение эффективно ингибирует взаимодействие молекул IgG и нанотела. Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что для блокировки такого взаимодействия к последовательности нанотела могут быть добавлены различные С-концевые удлинения (A, AA, AS, AST, ASTKP, GGGS). Предпочтительным С-концевым удлинением являются два аланиновых остатка (AA).

Обычно для облегчения экспрессии и продуцирования 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 более 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 более 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 настоящего изобретения были получены бипаратопные полипептиды согласно настоящему изобретению. 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 последовательно-

стью. Все указанные бипаратопные нанотела содержат первое нанотело, включающее первый антигенсвязывающий домен, способный связываться с линейным пептидом, состоящим из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7 (аминокислоты 1-19 CXCR2), и второе нанотело, включающее 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.

Как 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 будет 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 первый антигенсвязывающий домен выбран из SEQ ID NO: 213, 214, 216 и 219, или полипептида, имеющего последовательность, которая по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на 95% идентична одной из этих последовательностей, и второй антигенсвязывающий домен выбран из SEQ ID NO: 215, 217 и 218, или полипептида, имеющего последовательность, которая по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на 95% идентична одной из этих последовательностей.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанный полипептид, содержащийся в указанном втором иммуноглобулине, состоящем из одного вариабельного домена, включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 141; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 236, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 181, и полипептид, содержащийся в указанном первом иммуноглобулине, состоящем из одного вариабельного домена, включает CDR4, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 146; CDR5, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 237, и CDR6, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 186. 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, представленных в SEQ ID NO: 141, 236, 181, 146, 237 или 186.

В другом варианте осуществления изобретения полипептид включает аминокислотные последовательности, отличающиеся от последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 141, 236, 181, 146, 237 или 186, только консервативными аминокислотными заменами.

В другом варианте осуществления изобретения полипептид содержит первый антигенсвязывающий домен, выбранный из SEQ ID NO: 216 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: 216, и второй антигенсвязывающий домен, выбранный из SEQ ID NO: 217 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: 217.

В еще одном варианте осуществления изобретения полипептид включает последовательность SEQ ID NO: 221.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанный полипептид, содержащийся в указанном втором иммуноглобулине, состоящем из одного вариабельного домена, включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 141; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 236, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 181, и полипептид, содержащийся в указанном первом иммуноглобулине, состоящем из одного вариабельного домена, включает CDR4, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 145; CDR5, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 165, и CDR6, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 185. 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, представленных в SEQ ID NO: 141, 236, 181, 145, 165 или 185.

В другом варианте осуществления изобретения полипептид включает аминокислотные последова-

тельности, отличающиеся от последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 141, 236, 181, 145, 165 или 185, только консервативными аминокислотными заменами.

В другом варианте осуществления изобретения полипептид содержит первый антигенсвязывающий домен, выбранный из SEQ ID NO: 216 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: 216, и второй антигенсвязывающий домен, выбранный из SEQ ID NO: 218 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: 218.

В еще одном варианте осуществления изобретения полипептид включает последовательность SEQ ID NO: 222.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанный полипептид, содержащийся в указанном втором иммуноглобулине, состоящем из одного вариабельного домена, включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 141; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 236, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 181, и полипептид, содержащийся в указанном первом иммуноглобулине, состоящем из одного вариабельного домена, включает CDR4, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 143; CDR5, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 235, и CDR6, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в 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, представленных в SEQ ID NO: 141, 236, 181, 143, 235 или 183.

В другом варианте осуществления изобретения полипептид включает аминокислотные последовательности, отличающиеся от последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 141, 236, 181, 143, 235 или 183, только консервативными аминокислотными заменами.

В другом варианте осуществления изобретения полипептид содержит первый антигенсвязывающий домен, выбранный из SEQ ID NO: 216 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: 216, 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.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанный полипептид, содержащийся в указанном втором иммуноглобулине, состоящем из одного вариабельного домена, включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 151; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 171, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 191, и полипептид, содержащийся в указанном первом иммуноглобулине, состоящем из одного вариабельного домена, включает CDR4, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 146; CDR5, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 237, и CDR6, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 186. 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, представленных в SEQ ID NO: 151, 171, 191, 146, 237 или 186.

В другом варианте осуществления изобретения полипептид включает аминокислотные последовательности, отличающиеся от последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 151, 171, 191, 146, 237 или 186, 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: 217 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: 217.

В еще одном варианте осуществления изобретения полипептид включает последовательность SEQ ID NO: 223.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанный полипептид, содержащийся в указанном втором иммуноглобулине, состоящем из одного вариабельного домена, включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 151; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 171, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 191, и полипептид, содержащийся в ука-

занном первом иммуноглобулине, состоящем из одного вариабельного домена, включает CDR4, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 145; CDR5, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 165, и CDR6, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 185. 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, представленных в SEQ ID NO: 151, 171, 191, 145, 165 или 185.

В другом варианте осуществления изобретения полипептид включает аминокислотные последовательности, отличающиеся от последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 151, 171, 191, 145, 165 или 185, 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: 218 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: 218.

В еще одном варианте осуществления изобретения полипептид включает последовательность SEQ ID NO: 224.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанный полипептид, содержащийся в указанном втором иммуноглобулине, состоящем из одного вариабельного домена, включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 151; CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 171, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 191, и полипептид, содержащийся в указанном первом иммуноглобулине, состоящем из одного вариабельного домена, включает CDR4, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 143; CDR5, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 235, и CDR6, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в 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, представленных в SEQ ID NO: 151, 171, 191, 143, 235 или 183.

В другом варианте осуществления изобретения полипептид включает аминокислотные последовательности, отличающиеся от последовательностей, представленных в 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.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептидам и, в частности, к отдельным вариабельным доменам иммуноглобулина, таким как V_{HH}-домен, или к нанотелам, которые являются моновалентными в отношении связывания с CXCR2, и которые представляют собой структурные элементы для бипаратопных полипептидов по изобретению и могут рассматриваться как промежуточные соединения в способе их продуцирования. Предпочтительными отдельными вариабельными доменами моновалентного иммуноглобулина являются полипептиды, имеющие последовательности, представленные 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 моновалентным полипептидом является полипептид, обозначенный 137B7 и содержащий аминокислотную последовательность, представленную в 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, представленной в SEQ ID NO: 36. В предпочтительном варианте осуществления изобретения каркасные области SEQ ID NO: 36 имеют одну или более последовательность-оптимизирующих аминокислотных замен. Другими предпочтительными моновалентными полипептидами являются полипептиды, обозначенные 127D1, 2B2, 54B12, 97A9, 163D2 и 163E3, включая полипептиды, имеющие оптимизированную последовательность в каркасных областях.

Так, например, 127D1 может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, в которую были введены одна или более последовательность-оптимизирующих аминокислотных замен,

представленных в табл. 26, и предпочтительно указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 216.

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

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

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

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

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

В этот аспект изобретения также входят моновалентные полипептиды и, в частности, отдельные вариабельные домены иммуноглобулина, такие как нанотела, обладающие способностью перекрестно блокировать связывание CXCR2 с полипептидом, имеющим аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47 или 61.

Любое из обсуждаемых выше предпочтительных моновалентных нанотел и, в частности, 137B7, может быть использовано в описанных в данном описании целях, например, для лечения ХОБЛ.

Бипаратопные полипептиды по изобретению и, в частности, предпочтительные отдельные вариабельные домены бипаратопного иммуноглобулина, обсуждаемые выше, включая все их верблюжьи и гуманизированные варианты, представляют собой модуляторы CXCR2, которые, в частности, ингибируют передачу CXC2-сигнала.

Предпочтительно CDR-последовательности и FR-последовательности в бипаратопных полипептидах и, в частности, в отдельных вариабельных 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^{-12} моль/л или менее и 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 и 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 $M^{-1}c^{-1}$ и приблизительно до 10^7 $M^{-1}c^{-1}$; предпочтительно от 10^3 $M^{-1}c^{-1}$ до 10^7 $M^{-1}c^{-1}$; более предпочтительно от 10^4 $M^{-1}c^{-1}$ до 10^7 $M^{-1}c^{-1}$; а именно от 10^5 $M^{-1}c^{-1}$ до 10^7 $M^{-1}c^{-1}$;

и/или тем, что они

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

Предпочтительно, чтобы CDR-последовательности и FR-последовательности, присутствующие в полипептидах и в отдельных вариабельных 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]GTPγS в CXCR2-CHO-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 вариабельный домен бипаратопного иммуноглобулина, например описанное в данном описании нанотело, перекрестно блокирует связывание с CXCR2-полипептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и с любым или со всеми полипептидами, представленными в SEQ ID NO: 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47 или 61. Перекрестное блокирование может быть измерено любыми методами, хорошо известными специалистам в данной области.

Полипептиды по изобретению, подходящие для их использования в фармацевтике, например полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, предпочтительно должен быть направлен непосредственно против CXCR2 человека, и полипептиды по изобретению, подходящие для их использования в ветеринарии, предпочтительно должны быть направлены против CXCR2, происходящего от любого вида животного, подвергающегося лечению, либо они должны быть способны перекрестно взаимодействовать, по меньшей мере, с CXCR2, происходящего от любого 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 более дополнительных сайтов связывания или доменов, связывающихся с другими эпитопами, антигенами, белками или мишенями.

Эффективность полипептидов по изобретению и композиций, содержащих указанные полипептиды, 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, может ли такой полипептид быть использован для лечения ХОБЛ или любого другого заболевания, связанного с нарушением передачи CXCR2-сигнала. Подходящие анализы и животные-модели известны специалистам в данной области.

Кроме того, согласно настоящему изобретению полипептиды, направленные против CXCR2 человека, могут перекрестно реагировать и 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 ограничиваясь ими, обезьяны, принадлежащие к роду Macaca (такие как, в частности, собакоподобные обезьяны (Macaca fascicularis) и/или макак-резус (Macaca mulatta)) и павианы (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 более видов, которые часто используются в качестве модели заболевания (например, от мышей, крыс, кроликов, свиней или собак) и, в частности, от животных с моделью заболеваний и расстройств, связанных с CXCR2. В соответствии с этим для специалиста в данной области будет 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 таких моделях 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, то есть сайта, в котором CXCR2 взаимодействует с другой молекулой, например с его природным лигандом или лигандами.

Бипаратопный полипептид, например один вариабельный 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 и, в частности, бипаратопные нанотела, 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 более антигенных детерминант или один или более 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 обсуждено выше, или отличающимися от них (то есть с более высокой или более низкой аффинностью или специфичностью). Кроме того, как известно специалистам в данной области, бипаратопные полипептиды связываются с CXCR2 с большей авидностью, 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 и, в частности, отдельных вариабельных доменов бипаратопного иммуноглобулина по изобретению, используемые в различных обсуждаемых в данном описании терапевтических целях, при условии, что они включают релевантные функциональные домены, эквивалентные доменами полноразмерного полипептида. Такие части, фрагменты, аналоги, мутанты, варианты, аллели или производные могут обладать всеми функциональными свойствами, обсуждаемыми выше для бипаратопных полипептидов по изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к отдельным вариабельным доменам бипаратопного иммуноглобулина, который также, но необязательно, содержит одну или несколько других групп, остатков, молекул или связывающих единиц. Такие дополнительные группы, остатки, молекулы, связывающие единицы или аминокислотные последовательности могут обеспечивать или нет дополнительными функциями полипептид по изобретению и могут модифицировать или нет его свойства.

Так, например, такими дополнительными группами, остатками, молекулами или связывающими единицами могут быть одна или более дополнительных аминокислотных последовательностей, таких как (гибридный) белок или (гибридный) полипептид. В предпочтительном, но не ограничивающем аспекте изобретения указанная одна или несколько других групп, остатков, молекул или связывающих единиц представляют собой последовательности иммуноглобулина. Еще более предпочтительно указанная 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 или не обладать биологической и/или фармакологической активностью.

Так, например, такие группы могут быть связаны с одним или более полипептидами по изобретению с образованием "производного" полипептида по изобретению, также описанного в настоящем описании.

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

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

Полипептиды этого аспекта изобретения могут быть получены, в основном, способом, который включает по меньшей мере одну стадию соответствующего связывания одного или более полипептидов по изобретению с одной или более другими группами, остатками, молекулами или связывающими единицами посредством, но необязательно, одного или более 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 описания, для специалиста в данной области будет очевидно, что некоторыми предпочтительными полипептидами являются такие полипептиды, которые, например, содержат аминокислотные последовательности, или полипептиды по изобретению, которые были химически модифицированы в целях увеличения их времени полужизни (например, посредством ПЭГилирования, ПАСилирования или ГЭКилирования); 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 моле-

кулой (и, 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 более сывороточными белками или их фрагментами (такими как сывороточный альбумин (человеческий) или его подходящие фрагменты) или с одной или более 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 сывороточный альбумин 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 более малыми белками или пептидами, которые могут связываться с сывороточными белками (такими как, но не ограничиваясь 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 PCT/EP 2007/063348)).

Один из наиболее широко применяемых способов увеличения времени полужизни и/или снижения иммуногенности фармацевтических белков включает присоединение подходящего фармакологически приемлемого полимера, такого как полиэтиленгликоль (ПЭГ) или его производные (такие как метоксиполиэтиленгликоль или мПЭГ). Вообще говоря, может быть использована любая форма ПЭГилирования, такая как ПЭГилирование, применяемое 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 применять сайт-направленное ПЭГилирование и, в частности, ПЭГилирование с использованием цистеинового остатка (см., например, Yang et al., Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003). Так, 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 более цистеиновых остатков для присоединения ПЭГ, либо аминокислотная последовательность, содержащая один или более цистеиновых остатков для присоединения ПЭГ, может быть связана с N- и/или С-концом бипаратопного полипептида, где все эти способы 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, и, 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 гидроксиэтилированного крахмала (ГЭК) к полипептидам по изобретению. Используемым гидроксиэтилированным крахмалом является амилопектин, происходящий от крахмала восковидной кукурузы, который был модифицирован посредством кислотного гидролиза для коррекции молекулярной массы, и в котором остатки глюкозы были гидроксиэтилированы. Более подробное описание можно найти в публикации Pavisic R., et al., Int. J. Pharm (2010) March 15, 387 (1-2):110-9.

Как правило, 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. Так, например, полипептиды по изобретению с увеличенным временем полужизни могут иметь время полужизни, 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 полипептида по изобретению per se.

В предпочтительном аспекте изобретения такие полипептиды по изобретению имеют 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 соответствующих полипептидов по изобретению per se.

В другом предпочтительном аспекте изобретения полипептиды по изобретению имеют время по-

лужизни в сыворотке человека, составляющее по меньшей мере приблизительно 12 ч, предпочтительно по меньшей мере 24 ч, более предпочтительно по меньшей мере 48 ч и еще более предпочтительно по меньшей мере 72 ч или более. Так, 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 данном описании полипептидов, нуклеиновых кислот, клеток-хозяев и композиций по изобретению.

Обычно такие способы могут включать следующие стадии:

a) получение серии, набора или библиотеки полипептидов;

b) скрининг указанных серий, наборов или библиотек полипептидов на аминокислотные последовательности, которые могут связываться с CXCR2 и/или обладают аффинностью в отношении CXCR2;

c) выделение аминокислотной(ых) последовательности(ей), которая(ые) может(ут) связываться с CXCR2 и/или обладает(ют) аффинностью в отношении CXCR2.

Серия, набор или библиотека полипептидов могут представлять собой серию, набор или библиотеку последовательностей иммуноглобулина (описанных в настоящем описании), такие как природная 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 таком способе серией, набором или библиотекой полипептидов могут быть серия, набор или библиотека вариабельных доменов тяжелой цепи (таких как V_H-домены или V_{HH}-домены) или вариабельных доменов легкой цепи. Так, 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 описанных выше 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 в данной области, например, исходя из настоящего описания. Специалист в данной области может также обратиться к публикации Hoogenboom in Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005).

В другом аспекте изобретения способ продуцирования полипептидов для применения при конструировании 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 в отношении 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.

Так, например, если предпочтительным полипептидом является последовательность иммуноглобулина, то таким набором или образцом клеток могут быть, например, набор или образец B-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 настоящем описании, ламу иммунизируют клетками млекопитающего, экспрессирующими CXCR2 человека; клетками млекопитающего, экспрессирующими CXCR2 собакоподобных обезьян; ДНК, кодирующей полно-

размерный CXCR2 человека; ДНК, кодирующей Δ1-17 CXCR2 человека; ДНК, кодирующей CXCR2 собакоподобных обезьян, и пептидами, представленными в табл. 5.

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

В другом аспекте изобретения способ продуцирования полипептида, направленного против CXCR2, для применения при конструировании полипептида по изобретению может включать по меньшей мере одну из следующих 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 в отношении CXCR2; и

c) выделение указанной последовательности нуклеиновой кислоты и осуществление последующей экспрессии указанного полипептида.

В таком способе серией, набором или библиотекой последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующей 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 таком способе серия, набор или библиотека последовательностей нуклеиновой кислоты могут кодировать серию, набор или библиотеку вариабельных доменов тяжелой цепи (таких как V_H-домены или V_{HH}-домены) или вариабельных доменов легкой цепи. Так, 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 серией, 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 продуцировании полипептидов по изобретению лам иммунизируют антигенами, как описано выше.

В описанных выше 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 в данной области, например, исходя из настоящего описания. Специалист в данной области может также обратиться к публикации Hoogenboom in Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005).

В другом аспекте изобретения способ продуцирования 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 в отношении 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 полу-

чены описанными выше способами или, альтернативно, способом, который включает проведение одной из описанных выше 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 экспрессией в подходящей клетке-хозяине или в организме-хозяине или стадией химического синтеза и конструирования бипаратопного полипептида на основе продуктов этого синтеза.

Указанный выше способ может быть осуществлен с применением любой подходящей технологии, известной специалистам в данной области и более подробно обсуждаемой ниже. Описание таких способов можно найти, например, в EP 0542810, WO 05/19824, WO 04/051268 и WO 04/106377. Так, например, стадию скрининга (b) предпочтительно осуществляют методом проточной цитометрии, такой как FACS. Описание этого метода можно найти, например, в публикации Lieby et al., Blood, Vol. 97, No. 12, 3820. Конкретное описание так называемого метода "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 (то есть 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 B-клеток), и затем продуцирование последовательностей V_{HH}, направленных против CXCR2, из указанного образца с применением любого подходящего метода, известного per se (такого как любой из описанных в данном описании методов или гибридомный метод). Так, например, для этих целей могут быть использованы мыши, экспрессирующие антитело с тяжелой цепью, и могут быть применены другие методы 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. Так, например, у такой мыши, экспрессирующей антитело с тяжелой цепью, могут экспрессироваться антитела с тяжелой цепью, содержащие любой подходящий (один) вариабельный домен, например (отдельные) вариабельные домены, происходящие от природных источников (например, (отдельные) вариабельные домены человека, верблюжьи (отдельные) вариабельные домены или (отдельные) вариабельные домены акулы), а также, например, синтетические или полусинтетические (отдельные) вариабельные домены.

Специалистам в данной области известны и другие подходящие методы 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 указанной в данном описании заявки WO 08/00279.

Домены V_{HH} или нанотела могут быть охарактеризованы по одному или более "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 и предпочтительно гуманизированной замены.

В соответствии с нумерацией по Кабату 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 включены в настоящее описание посредством ссылки. В настоящем изобретении также рассматриваются и другие известные специалистам в данной области гуманизированные или частично гуманизированные последовательности, которые входят в объем настоящего изобретения.

Как обсуждалось выше, нанотело для использования в настоящем изобретении может иметь, по меньшей мере, "отличие в одной аминокислоте" (как определено в настоящем описании) по меньшей мере в одной из каркасных областей по сравнению с соответствующей каркасной областью природного V_H-домена человека и, 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 настоящем описании) 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_H-домена человека и, 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-домене по меньшей мере в одной из FR2 и/или FR4 и, 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).

Также 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 настоящем описании) 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 определено в описании настоящего изобретения, при условии, что оно будет иметь, по меньшей мере, "отличие в одной аминокислоте" (как определено в настоящем описании) 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}-домене по меньшей мере в одной из FR2 и/или FR4 и, 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 данном описании общим термином "аналоги") одного вариабельного домена иммуноглобулина по изобретению, определенного в настоящем описании, и, 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 более аминокислотных остатков могут быть заменены, делетированы и/или добавлены по сравнению с отдельными вариабельными доменами иммуноглобулина по изобретению, определенными в настоящем описании. Такие замены, инсерции или делеции могут быть введены в одну или более каркасных областей и/или в одну или более CDR. Если такие замены, инсерции или делеции были сделаны в одной или более каркасных областях, то они могут быть введены в положения одного или более ключевых остатков и/или в одно или более 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 настоящем описании).

В одном из неограничивающих примеров заменой может быть, например, консервативная замена (описанная в настоящем описании) 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, по существу, не ограничивается такой заменой. Таким образом, в объем настоящего изобретения входят любые одна или более 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 (то есть 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 данном описании 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.

Так, 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 более сайтов посттрансляционной модификации (такие как один или более 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 более сайтов присоединения функциональных групп (как описано в настоящем описании), например, для сайт-специфического ПЭГилирования (как описано в настоящем описании).

Как описано в общих чертах в настоящем описании, 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.(y) 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 настоящем описании), которая определена в настоящем описании для бипаратопных нанотел по изобретению.

Предпочтительными аналогами также являются аналоги, которые сохраняют благоприятные свойства бипаратопных нанотел, описанных в настоящем описании.

Кроме того, в соответствии с одним из предпочтительных аспектов настоящего изобретения указанные аналоги имеют по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, а именно по меньшей мере 95 или 99% или более идентичность последова-

тельности; и/или предпочтительно имеют максимально 20, предпочтительно максимально 10, еще более предпочтительно максимально 5, а именно 4, 3, 2 или только 1 аминокислотое различие (как определено в настоящем описании) с одной из последовательностей SEQ ID NO: 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47, 61, 53, 54, 46, 69, 68, 67 или 66 бипаратопных нанотел.

Кроме того, каркасные последовательности и CDR указанных аналогов предпочтительно должны соответствовать определенным в данном описании предпочтительным аспектам изобретения. В более широком смысле, как описано в настоящем описании, аналоги имеют (a) Q в положении 108; и/или (b) заряженную аминокислоту или цистеиновый остаток в положении 45, предпочтительно E в положении 44 и 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 (то есть по сравнению с последовательностью природного нанотела). Как указано выше, такая гуманизация, по существу, включает замену одного или более аминокислотных остатков в последовательности природного V_{HH} аминокислотными остатками, которые присутствуют в том же самом положении человеческого V_H-домена, такого как человеческий V_H3-домен. Примеры возможных "гуманизирующих" замен, отличающихся от замен, конкретно указанных в табл. 20, 22, 24, 26, 28 и 30, приведены в настоящем описании, хотя специалистами в данной области могут быть сделаны и другие комбинации гуманизирующих замен, исходя из сравнения последовательности нанотела и последовательности природного человеческого V_H-домена и исходя из описания заявки WO 2008/020079, уже цитируемой в настоящем описании.

Обычно в результате гуманизации отдельные вариабельные домены иммуноглобулина и, в частности, нанотела по изобретению будут больше напоминать человеческие последовательности, но при этом будут сохранять благоприятные свойства описанных в данном описании 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 данном описании 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 более положениях ключевых остатков (определенных в настоящем описании) или в одном или более положениях других каркасных остатков (то есть 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 настоящем описании). Так, например, как указано выше, гуманизированные нанотела одного из наиболее предпочтительных классов имеют последовательность GLEW или GLEW-подобную последовательность в положениях 44-47; P, R или S (и 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 более методов, приведенных на стр. 103 и 104 заявки WO 08/020079.

Как указано выше, специалисту в данной области также известно, что отдельные вариабельные домены иммуноглобулина по изобретению (включая их аналоги) могут быть сконструированы и/или получены из человеческих последовательностей V_H (то есть 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 более кэмелизирующих замен (то есть замены одного или более аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности указанного V_H-домена человека на аминокислотные остатки, присутствующие в соответствующем положении в V_{HH}-домене) для продуцирования последовательности нанотела по изобретению и/или для сообщения полученной таким образом последовательности нанотела благоприятных свойств. Это может быть также осуществлено, в основном, с применением различных методов 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 более ключевых остатках, по существу, будут оказывать большее влияние на нужные свойства, чем замены в одном или более других положениях аминокислот, хотя в объем настоящего изобретения входят обе эти замены и любые подходящие их комбинации. Так, например, может быть введена одна или более кэмелизирующих замен, которые уже сообщают, по меньшей мере, некоторые нужные свойства, и 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 данном описании описания и, необязательно, после нетрудоемкого рутинного экспериментирования, которое может, например, включать введение ограниченного числа возможных кэмелизирующих замен и определение факта сообщения благоприятных свойств отдельным вариабельным 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 содержит, по меньшей мере, (a) Q в положении 108; и/или (b) заряженную аминокислоту или цистеиновый остаток в положении 45, предпочтительно E в положении 44 и более предпочтительно E в положении 44 и R в положении 45; и/или (c) P, R или S в положении 103, и, необязательно, одну или более дополнительных кэмелизирующих замен. Более предпочтительно кэмелизирующие замены должны быть введены так, чтобы это приводило к образованию одного вариабельного домена иммуноглобулина, используемого в настоящем изобретении, и/или его аналога (как определено в настоящем описании), такого как гуманизированный аналог, и/или предпочтительно аналог, как определено в предыдущих параграфах.

Отдельные вариабельные 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 VH-доменом. Так, например, такими заменами могут быть, но, не ограничиваясь ими, одна или более из следующих 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 и, в частности, путем химической и/или биологической (например, ферментативной) модификации бипаратопных полипептидов по изобретению и/или одного или более 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 (то есть 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.

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

Так, например, такая модификация может включать введение (например, посредством ковалентного связывания или другим подходящим способом) одной или более 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 сообщают любую комбинацию двух или более указанных выше свойств. Примеры таких функциональных групп и методы их введения известны специалистам в данной области, и такие примеры могут, как правило, включать все функциональные группы, известные специалистам в данной области, а также функциональные группы и методы, известные per se и применяемые для модификации фармацевтических белков и, в частности, для модификации антител или фрагментов антител (включая scFv и однодоменные антитела), где указанные функциональны группы и методы описаны, например, в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980). Такие функциональные группы могут быть, например, непосредственно присоединены (например, ковалентно) к бипаратопному полипептиду по изобретению, либо они могут быть присоединены, но необязательно, посредством подходящего линкера или спейсера, как известно специалистам в данной области.

Другая, обычно менее предпочтительная модификация включает 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 включать введение одной или более детектируемых меток или других

сигнал-генерирующих групп или молекул в зависимости от цели применения меченого полипептида или нанотела. Подходящие метки и методы их присоединения, использования и детектирования известны специалистам в данной области, и такими метками являются, но, не ограничиваясь ими, флуоресцентные метки, фосфоресцирующие метки, хемилюминесцентные метки, биолюминесцентные метки, радиоактивные изотопы, металлы, хелатные комплексы с металлами, катионы металлов, хромофоры и ферменты, например, приведенные 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 будет очевидно специалисту 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 ограничиваясь ими, диэтилентриаминпентауксусная кислота (DTPA) или этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA).

Другая модификация может включать 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 соединением, которые связываются с другой половиной связывающей пары, то есть с образованием связывающей пары. Так, например, бипаратопное нанотело по изобретению может быть конъюгировано с биотином и связано с другим белком, полипептидом, соединением или носителем, конъюгированным с авидином или с стрептавидином. Так, 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 с 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 Targetting, 8, 4, 257 (2000). Такие связывающие пары могут быть также использованы для присоединения терапевтически активного агента к нанотелу по изобретению.

Для применения в некоторых целях и, 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 в данной области и описаны в предшествующих работах, цитируемых выше и/или в подробном описании настоящего изобретения. Одним из примеров является так называемая технология ADEPT™, описанная в WO 03/055527.

Специалистам в данной области 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 настоящем описании), которая определена в настоящем описании для бипаратопных нанотел по изобретению.

Как указано 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 и 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 или не обладать таким действием, а также они могут придавать или не придавать дополнительные функциональные свойства. Так, 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 последовательности известны специалистам в данной области 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 в данной области и приведены в параграфе (c) 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 применением методов на основе аффинности в отношении указанной последовательности или указанного остатка. Затем указанная последовательность или остаток может быть удалены (например, путем химического или ферментативного расщепления) с получением последовательности бипаратопного полипептида (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 myc-метка (см., например, SEQ ID NO: 31 в заявке WO 06/12282);

могут представлять собой один или более аминокислотных остатков, которые могут быть функционализированы и/или могут служить сайтом присоединения функциональных групп. Подходящие аминокислотные остатки и функциональные группы известны специалистам в данной области, и такими остатками и группами являются, но не ограничиваясь ими, аминокислотные остатки и функциональные группы, приведенные в данном описании при описании производных бипаратопных полипептидов или нанотел по изобретению.

Согласно другому аспекту бипаратопный полипептид по изобретению содержит бипаратопное нанотело по изобретению, которое присоединено по меньшей мере к одному другому пептиду или полипептиду у аминоконца, у карбоксиконца или у аминоконца и у карбоксиконца, с получением гибридного белка, включающего указанное бипаратопное нанотело по изобретению и один или более других пептидов или полипептидов. Такой гибрид также называется в данном описании "гибридным нанотелом".

Предпочтительно такой дополнительный пептид или полипептид сообщает бипаратопному нанотелу или полипептиду по изобретению одно или более нужных свойств или функциональных признаков.

Так, 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 в данной области и могут, по существу, включать все аминокислотные последовательности, используемые для получения пептидных гибридов 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).

Так, 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 сывороточный альбумин человека (см., например, WO 00/27435) или гаптеновые 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 уве-

личения времени полужизни. Их описание можно найти в WO 00/27435 и WO 01/077137. Согласно настоящему изобретению бипаратопные полипептиды и предпочтительно бипаратопное нанотело по изобретению связывается с сывороточным альбумином (или с его подходящим фрагментом) либо непосредственно, либо посредством подходящего линкера и, в частности, подходящего пептидного линкера, в результате чего полипептид по изобретению может экспрессироваться как генетический гибрид (белок). В одном из конкретных аспектов 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 обсуждалось выше, дополнительный пептид или полипептид может вводить дополнительный сайт связывания или связывающую единицу, которые непосредственно связываются с сывороточным белком (таким как, например, сывороточный альбумин 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 (см. также PCT/EP 2007/063348).

Такие пептиды или полипептиды могут быть, в частности, направлены против сывороточного альбумина (а более конкретно, против сывороточного альбумина человека) и/или против IgG (а более конкретно, против IgG человека). Так, например, такими аминокислотными последовательностями могут быть аминокислотные последовательности, направленные непосредственно против (человеческого) сывороточного альбумина, и аминокислотные последовательности, которые могут связываться с аминокислотными остатками на (человеческом) сывороточном альбумине, 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 сывороточного альбумина человека, и которые перекрестно реагируют с сывороточным альбумином, происходящим от млекопитающих по меньшей мере одного вида и, 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 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 более дополнительных пептидных, полипептидных или белковых последовательностей могут содержать одну или более частей, один или более фрагментов или один или более доменов стандартных 4-цепочечных антител (и, в частности, человеческих антител) и/или антител с тяжелой цепью. Так, например, бипаратопное нанотело по изобретению может связываться со стандартным (предпочтительно человеческим) 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 более (предпочтительно человеческими) C_H1-, C_H2- и/или C_H3-доменами, необязательно, посредством линкерной последовательности. Так, 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 более бипаратопных полипептидов или одно или более бипаратопных нанотел по изобретению могут быть связаны (необязательно, посредством подходящего линкера или шарнирной области) с одним или более 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 более частями,

фрагментами или доменами антитела, которые сообщают полипептиду по изобретению одну или более эффекторных функций, и/или которые могут сообщать этому полипептиду способность связываться с одним или более Fc-рецепторами. Так, например, один или более дополнительных пептидов или полипептидов, используемых в этих целях, но не ограничиваясь ими, могут содержать один или более C_H2- и/или C_H3-доменов антитела, например антитела с тяжелой цепью (как описано в настоящем описании), и более предпочтительно стандартного человеческого 4-цепочечного антитела; 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. Так, например, в WO 94/04678 описаны антитела с тяжелой цепью, содержащие V_{HH}-домен верблюда или его гуманизированное производное (то есть нанотело), в которых верблюжьи C_H2- и/или C_H3-домены были заменены C_H2- и C_H3-доменами человека с образованием иммуноглобулина, который состоит из 2 тяжелых 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 в данной области 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 (то есть 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 более бипаратопных полипептидов, таких как нанотела, и один или более константных доменов с увеличенным временем полужизни in vivo, известны специалистам в данной области и могут, например, включать два нанотела, связанных с C_H3-доменом, необязательно, посредством линкерной последовательности. Как правило, любой гибридный белок или любые производные с увеличенным временем полужизни предпочтительно имеют молекулярную массу более чем 50 кД, то есть предельную величину для адсорбции в почках.

В другом конкретном, но не ограничивающем аспекте изобретения для получения полипептида по изобретению одна или более аминокислотных последовательностей по изобретению могут быть присоединены (необязательно, посредством подходящего линкера или подходящей шарнирной области) к природным, синтетическим или полусинтетическим константным доменам (или к их аналогам, вариантам, мутантам, частям или фрагментам), которые имеют пониженную тенденцию (или, по существу, не обнаруживают такой тенденции) к самосборке в димеры (то есть по сравнению с константными доменами, которые обычно присутствуют в стандартных 4-цепочечных антителах). Такие мономерные (то есть 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.

Такие варианты мономерной Fc-цепи также 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, по существу, 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 в данной области, и такими аминокислотными последовательностями являются, например, но, не ограничиваясь ими, аминокислотные последовательности, приведенные на стр. 118 заявки WO 08/020079. Для применения в некоторых целях и, в частности, для уничтожения клеток, экспрессирующих мишень, про-

тив 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 (цито)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 в данной области и описаны в предшествующих работах, цитируемых выше и/или в подробном описании настоящего изобретения. Одним из примеров является так называемая технология ADEPT™, описанная в WO 03/055527.

В соответствии с одним необязательным и неограничивающим аспектом изобретения указанный один или более дополнительных пептидов или полипептидов содержат по меньшей мере одно дополнительное нанотело и 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 более линкерных последовательностей (как определено в настоящем описании).

И наконец, в объем настоящего изобретения также входят бипаратопные полипептиды по изобретению, которые могут содержать два или более нанотел и один или более дополнительных пептидов или полипептидов (как приведено в настоящем описании).

Описание поливалентных и мультиспецифических полипептидов, содержащих два или более V_{HH}-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., приведенных в настоящем описании.

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 и, в частности, сывороточного белка человека, такого как сывороточный альбумин человека; белок, связывающийся с тироксином; (человеческий) трансферин; 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 (и, в частности, с сывороточным альбумином человека) или с IgG (и, в частности, с IgG человека, см., например, описание нанотела VH-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 мышиной сыворотки (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 сывороточного альбумина 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, приведенные выше.

Так, например, некоторыми предпочтительными нанотелами, которые сообщают увеличенное время полужизни и которые могут быть использованы в настоящем изобретении, являются нанотела, которые могут связываться с аминокислотными остатками на (человеческом) сывороточном альбумине 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, приведенную в данном описании заявку WO 08/028977, Ablynx N.V.); нанотела, которые направлены против сывороточного альбумина человека и которые перекрестно реагируют с сывороточным альбумином, происходящим от млекопитающих по меньшей мере одного вида и, 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. 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., приведенную в настоящем описании) и/или нанотела, которые связываются в зависимости от определенных условий (см., например, заявку 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 поми-

мо двух или более нанотел по меньшей мере одно нанотело, направленное против сывороточного альбумина 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, p1186-1190.

Как правило, любые полипептиды по изобретению с увеличенным временем полужизни, которые содержат одно или более 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. Так, например, такое производное или полипептиды с увеличенным временем полужизни имеют время полужизни, 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 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 и еще более предпочтительно по меньшей мере 72 ч или более. Так, 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 включает 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 компартментам клеток, и/или позволяет такому полипептиду по изобретению проникать или проходить в них, и/или которое позволяет 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, ассоциированные 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 более 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 более подходящих спейсеров или линкеров или любых их комбинаций.

Согласно одному их аспектов изобретения полипептид по изобретению присутствует, по существу, в выделенной форме, как определено в настоящем описании.

Аминокислотные последовательности, бипаратопные нанотела, полипептиды и нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть получены известным способом per se, что будет очевидным для специалистов в данной области из подробного описания настоящего изобретения. Так, например, бипаратопные нанотела и полипептиды по изобретению могут быть получены любым известным способом per se, применяемым для получения антител и, в частности, для получения фрагментов антител (включая, но не ограничиваясь ими, (одно)доменные антитела и scFv-фрагменты). Некоторыми предпочтительными, но неограничивающими способами получения аминокислотных последовательностей, нанотел, полипептидов и нуклеиновых кислот являются методы и технологии, описанные в настоящем описании.

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 данном описании "хозяином по изобретению") или в другой подходящей экспрессионной системе, нуклеиновой кислоты, которая кодирует указанное бипаратопное нанотело или указанный полипеп-

тид по изобретению (также называемой в данном описании "нуклеиновой кислотой по изобретению"), и необязательно

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

В частности, указанный способ может включать следующие стадии:

i) культивирования 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 данном описании "нуклеиновой кислотой по изобретению" и может иметь, например, форму генетической конструкции, более подробно описанной ниже.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, выбранную из группы аминокислотных последовательностей, представленных в 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 включают 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. Так, 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).

Согласно одному их аспектов изобретения нуклеиновая кислота по изобретению присутствует, по существу, в выделенной форме, как определено в настоящем описании.

Нуклеиновая кислота по изобретению может также иметь форму вектора, такого как плазмида, 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 данном описании 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 для конструирования нуклеиновой кислоты по изобретению, кодирующей указанный аналог. Кроме того, как будет очевидно специалисту 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 более линкеров, могут быть присоединены друг к другу соответствующим образом.

Способы продуцирования нуклеиновых кислот по изобретению известны специалистам в данной области и могут включать, например, но не ограничиваясь 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 более 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 в данной области и описаны в стандартных руководствах, таких как руководства Sambrook et al. и Ausubel et al., приведенные выше, а также в приведенных ниже 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 включают по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту по изобретению, которая присоединена, но необязательно, к одному или более элементам генетической конструкции, известным per se, таким как, например, один или более подходящих регуляторных элементов (таких как подходящий(ие) промотор(ы), энхансер(ы), терминатор(ы) и т.п.), и к другим элементам описанных в данном описании генетических конструкций. Такие генетические конструкции, содержащие по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту по изобретению, называются в данном описании "генетическими конст-

рукциями 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, плазмида, космида, YAC, вирусный вектор или транспозон. В частности, указанным вектором может быть экспрессионный вектор, то есть 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 включает

i) по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту по изобретению, функционально присоединенную

ii) к одному или более 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; и генетические 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, то есть для экспрессии и/или продуцирования бипаратопного нанотела или полипептида по изобретению. Подходящие хозяева или клетки-хозяева известны специалистам в данной области, и ими могут быть, например, любые подходящие клетки или клеточные линии грибов, прокариотов или эукариотов, или любые подходящие микроорганизмы, такие 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 продуцирования антител и фрагментов антител (включая, но не ограничиваясь ими, (одно)доменные антитела и scFv-фрагменты), известных специалистам в данной области. 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 более 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 генотерапии), 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 получены в форме так называемых "интраантител", описанных, например, в WO 94/02610, WO 95/22618 и 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 ограничивающими примерами экспрессии является экспрессия в зернах пшеницы, в лизатах кроличьих ретикулоцитов или в системе E.coli Zubay.

Как указано 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 в данной области, 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, пригодные 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 экспресии/крупномасштабного продуцирования/крупномасштабной ферментации и, в частности, для крупномасштабной экспрессии/крупномасштабного продуцирования/крупномасштабной ферментации в фармацевтических целях (то есть в случае использования GMP). Подходящие примеры таких штаммов известны специалистам в данной области. Такие штаммы и системы продуцирования/экспрессии могут также поставляться такими компаниями, как Biovitrum (Uppsala, Sweden).

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

Выбор конкретной экспрессионной системы частично зависит от требований, предъявляемых к некоторым посттрансляционным модификациям, и более конкретно, к гликозилированию. Для продуцирования рекомбинантного белка, содержащего нанотело, при котором желательно или необходимо гликозилирование, может потребоваться использование соответствующих млекопитающих-хозяев для экспрессии, способных гликозилировать экспрессированный белок. В соответствии с этим специалисту в данной области известно, что профиль гликозилирования (то есть вид, число и положение присоединяемых остатков) зависит от клетки или клеточной линии, используемых для экспрессии. При этом предпочтительно использовать человеческую клетку или клеточную линию (то есть 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, и 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 указанные выше клетки-хозяева и экспрессионные системы, при условии, что они будут продуцировать нужное бипаратопное нанотело или нужный бипаратопный полипептид.

Таким образом, согласно одному их 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 и, в частности, в бактериальной клетке, подходящей для крупномасштабного производства фармацевтических средств, а именно в клетках указанных выше штаммов.

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

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

Как описано на стр. 138 и 139 заявки WO 08/020079, если экспрессию в клетке-хозяине осуществляют для продуцирования бипаратопных нанотел и полипептидов по изобретению, то эти антитела и полипептиды либо продуцируют внутри клеток (например, в цитозоле, в периплазме или в тельцах включения), и затем выделяют из клеток-хозяев и дополнительно, но необязательно, очищают, либо их продуцируют во внеклеточном пространстве (например, в среде для культивирования клеток-хозяев) и 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 продуцированы внутри клеток и выделены из клеток-хозяев и, 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 продуцированы 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, приведены 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, приведены на стр. 140 заявки WO 08/020079.

Подходящие методы трансформации хозяина или клетки-хозяина по изобретению известны специалистам в данной области 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, приведенных 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 клеточной 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 (и 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, продуцировано посредством деления клетки или путем полового или бесполого размножения.

Для продуцирования/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/продуцированию (нужного) бипаратопного нанотела или полипептида по изобретению. Подходящие условия известны специалистам в данной области 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 приведено в указанных выше руководствах и в патентных заявках, в параграфах, относящихся к генетическим конструкциям по изобретению.

Как правило, 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 данной области. В таких условиях полипептид по изобретению может также экспрессироваться конститутивно, транзиентно или только в присутствии соответствующего индуктора.

Для специалиста в данной области также будет очевидно, что бипаратопное нанотело или полипептид по изобретению могут быть (сначала) продуцированы в незрелой форме (как указано выше), и 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 (то есть с использованием антител против выделяемой аминокислотной последовательности).

Как правило, 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, эксципиент и/или адъювант, и необязательно, один или более 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, для внутривенной, внутримышечной или подкожной инъекции или для внутривенного вливания), для местного введения, для введения путем ингаляции (например, с помощью аэрозольного ингалятора, ингалятора с дозируемым клапаном (MDI) или инсуффлятора (DPI)), или для интраназального введения; в форме кожного пластыря, имплантата, суппозиториев, 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 в данной области и более подробно описаны ниже.

Таким образом, в другом 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 и более предпочтительно по меньшей мере одно бипаратопное нанотело по изобретению и по меньшей мере один подходящий носитель, разбавитель или эксципиент (то есть подходящий для использования в фармацевтике) и, необязательно, одно или более других активных веществ.

Обычно бипаратопные полипептиды по изобретению могут быть получены и введены любым подходящим способом, известным per se, например описанным в цитируемых выше заявках (и, 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 Publishing 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 диантитела), а также других фармацевтически активных белков. Такие препараты и способы их получения известны специалистам в данной области, и такими препаратами являются препараты, подходящие для парентерального введения (например, для внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, внутримышечного, внутрипросветного, внутриартериального или интратекального введения) или для местного (то есть 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 ограничиваясь ими, носители или разбавители, приведенные на стр. 143 заявки WO 08/020079. При этом предпочтительными являются водные растворы или суспензии.

Бипаратопные полипептиды по изобретению, включая отдельные вариабельные домены бипаратопного иммуноглобулина и бипаратопного нанотела, могут быть также введены методами генотерапии, см., например, патент США 5399346, который во всей своей полноте включен в настоящее описание посредством 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 вариабельные 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 более эксципиентами 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 вариабельного домена иммуноглобулина или нанотела по изобретению. Их процентное содержание в композициях и препаратах может варьироваться, но обычно оно составляет приблизительно от 2 до 60 мас.% указанной унифицированной лекарственной формы. 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, эксципиенты, дезинтегрирующие агенты, лубриканты, подсластители или ароматизаторы, например, приведенные

на стр. 143-144 заявки WO 08/020079. Если единичной дозированной формой является капсула, то она может содержать помимо веществ указанного выше 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 единичной дозированной формы. Так, 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 изготовления любой единичной дозированной формы, должно быть фармацевтически приемлемым и, по существу, нетоксичным при его использовании в определенных количествах. Кроме того, бипаратопные нанотела, отдельные вариабельные 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 изготовлены 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 вариабельные домены иммуноглобулина и полипептиды по изобретению могут быть также введены внутривенно или внутрибрюшинно путем вливания или инъекции, как подробно описано на стр. 144 и 145 заявки WO 08/020079.

Для местного введения бипаратопные нанотела, отдельные вариабельные домены иммуноглобулина и полипептиды по изобретению могут быть изготовлены в чистой форме, то есть если они являются жидкостями. 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.

Обычно концентрация бипаратопных нанотел, отдельных вариабельных доменов иммуноглобулина и полипептидов по изобретению в жидкой композиции, такой как лосьон, составляет приблизительно 0,1-25 мас.% и 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.% и 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, транплантатов или органов.

Желаемой дозой обычно является разовая доза или дробные дозы, вводимые через соответствующие интервалы, например два, три, четыре или более раз в день. Такая дробная 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 и предпочтительно несколько недель, месяцев или лет. Необходимые изменения в этой схеме введения могут быть внесены самим специалистом в данной области с помощью только рутинного экспериментирования в соответствии с описанием, приведенном в данном описании. 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, предпочтительно отдельных вариабельных доменов бипаратопного иммуноглобулина или бипаратопных нанотел, или композиции, содержащей такие домены или нанотела по изобретению. Как обсуждается в настоящем описании, 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, ENA 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 предупреждения 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 и, 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, в лечении ХОБЛ и обострений ХОБЛ.

Как будет очевидно для читателя-специалиста, бипаратопные полипептиды по изобретению и, 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, которые можно предупреждать или лечить 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, ассоциированное 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 реперфузионнное повреждение.

Другими заболеваниями и состояниями, которые можно предупреждать или лечить с использованием бипаратопных полипептидов по изобретению, например отдельных вариабельных доменов бипаратопного иммуноглобулина или бипаратопных нанотел и содержащих их фармацевтических композиций, являются закупорка сосудов, вызванная гемолитической трансфузией при серповидно-клеточной анемии, ишемическое/реперфузионнное повреждение, острый инсульт/инфаркт миокарда, закрытая травма головы, посттравматическое воспаление и инсулинорезистентный диабет.

Для осуществления описанных выше способов бипаратопные нанотела, отдельные вариабельные 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, внутрибрюшинно (например, внутривенно, подкожно, внутримышечно или любым другим способом введения в обход желудочно-кишечного тракта), интраназально, трансдермально, местно, с помощью суппозиториев 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 вариабельные домены иммуноглобулина и/или полипептиды по изобретению, и/или содержащие их композиции вводят в соответствии со схемой лечения, которая является наиболее подходящей для предупреждения и/или лечения данного заболевания или расстройства. Обычно врач-клиницист может самостоятельно выбрать подходящую схему лечения в зависимости от таких факторов, как конкретное заболевание или расстройство, которое должно быть подвергнуто лечению или профилактике; тяжесть заболевания, подвергаемого лечению, и/или тяжесть его симптомов; конкретно используемые бипаратопные нанотела; отдельные вариабельные домены иммуноглобулина или полипептиды по изобретению; конкретная схема введения, конкретно используемый фармацевтический препарат или фармацевтическая композиция; возраст, пол, масса тела, режим питания, общее состояние здоровья пациента, а также от других аналогичных факторов, хорошо известных врачам-клиницистам.

Как правило, для предупреждения и/или лечения указанных выше заболеваний и расстройств и, в частности, ХОБЛ, вводимая доза будет зависеть от активности конкретно используемых бипаратопных нанотел, отдельных вариабельных доменов иммуноглобулина или полипептидов по изобретению, конкретного способа введения и конкретно используемых фармацевтических препаратов или композиций. Обычно 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 более дробных доз в течение суток. Как правило, врач-клиницист может самостоятельно определить подходящую суточную дозу в зависимости от приведенных в данном описании 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 вариабельные домены иммуноглобулина и полипептиды по изобретению могут быть также использованы в комбинации с одним или более дополнительными фармацевтически активными соединениями или действующими веществами лекарственного средства, то есть они могут быть введены в соответствии с конкретной комбинированной схемой лечения, которая может давать или нет 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 указанных выше факторов и исходя из результатов экспертной оценки.

Так, 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 согласно настоящему изобретению, 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 предотвращения, 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.

Обычно 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.

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

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

Все цитируемые в данном описании публикации вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

1. Клонирование CXCR2 человека и собакоподобных обезьян.

Таблица 1

CXCR2 человека SEQ ID NO:1	MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSSTLPPFLLDAAPCEPESLEINKYFVVIIYALV FLLSLLGNSLVMLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPIWAASKVNGWIFGTFL CKVVSLLKEVNFYSGILLLACISVDRYLAIVHATRTLTQKRYLVKFICLSIWGLSLLLALP VLLFRRTVYSSNVSPACYEDMGNNTANWRMLLRILPQSFGFIVPLLIMLFCYGFTLRT LFKAHMGQKHRAMRVIFAVVLIFLLCWLPYNLVLLADTLMRTQVIQETCERRNHIDRA LDATEILGILHSCLNPLIYAFIGQKFRHGLLKILAIHGLISKDSLPKDSRPSFVGSSSGHT STTL
Δ1-17 CXCR2 человека SEQ ID NO:2	MEDLSNYSYSSTLPPFLLDAAPCEPESLEINKYFVVIIYALVFLLSLLGNSLVMLVILYS RVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPIWAASKVNGWIFGTFLCKVVSLLKEVNFYSGIL LLACISVDRYLAIVHATRTLTQKRYLVKFICLSIWGLSLLLALPVLLFRRTVYSSNVSPA CYEDMGNNTANWRMLLRILPQSFGFIVPLLIMLFCYGFTLRTLFKAHMGQKHRAMRV IFAVVLIFLLCWLPYNLVLLADTLMRTQVIQETCERRNHIDRALDATEILGILHSCLNPLI YAFIGQKFRHGLLKILAIHGLISKDSLPKDSRPSFVGSSSGHTSTTL
CXCR2 собакоподобных обезьян SEQ ID NO:3	MQSFNFEDFWENEDFSNYSYSSDLPPSLPDVAPCRPESLEINKYFVVIIYALVFLLSLL GNSLVMLVILHSRVGRSITDVYLLNLAMADLLFALTLPIWAAAKVNGWIFGTFLCKVVS LLKEVNFYSGILLLACISVDRYLAIVHATRTLTQKRYLVKFVCLSIWSLSLLLALPVLLFR RTVYLTYISPVCYEDMGNNTAKWRMVLRILPQTFGFILPLLIMLFCYGFTLRTLFKAHM GQKHRAMRVIFAVVLIFLLCWLPYHLVLLADTLMRTRLINETCQRRNNIDQALDATEIL GILHSCLNPLIYAFIGQKFRHGLLKILATHGLISKDSLPKDSRPSFVGSSSGHTSTTL

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

Таблица 2

Конструкции

Рецептор	Вектор	Конструкция
CXCR2 человека (N-концевая 3×HA-метка)	pcDNA4/TO	Субклонировали последовательность ДНК, кодирующую три HA-метки, затем последовательность CXCR2 человека, и 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×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, и 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×HA-метка)	pcDNA4/TO	Субклонировали последовательность ДНК, кодирующую три HA-метки, затем последовательность CXCR2 человека без N-концевых 17 аминокислот, и затем (в скобках) сайты рестриктирующих ферментов HindIII и XhoI в 5′- и 3′-концы, соответственно, в pcDNA4/TO
CXCR2 человека	pXoon	кДНК CXCR2 человека (hCXCR2) (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_3×HA-Δ1-17-hCXCR2
Δ1-17 CXCR2 человека (N-концевая 3×HA-метка)	pcDNA3.1	HindIII-XhoI от pCR4Blunt-TOPO_3×HA-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.

Таблица 3

Клеточные линии

Хозяин	Трансформация	Рецептор	Вектор
CHO	Стабильная	Δ1-17 CXCR2 человека (N-концевая 3×HA-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	Δ1-17 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 Δ1-17	pcDNA4/TO
L2071	Стабильная	CXCR2 человека	pSFFV-Neo
CEM	Эндогенная	CXCR4	-

CXCR2 человека Δ1-17 CHO-K1 (N-концевая 3×HA-метка).

Клетки CHO-K1 трансфицировали плазмидой pcDNA3.1_3×HA-Δ1-17-hCXCR2 с использованием системы электропорации Amaxa (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 FMAT Blue-меченого Gro-α человека. FMAT Blue-мечение Gro-α человека (Biosource, PHC1063) осуществляли с использованием набора с монофункциональным реактивным красителем FMAT 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 человеческого Δ1-17 CXCR2 на устройстве FACSarray (BD Biosciences) с использованием FMAT Blue-меченого 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 (cCXCR2) на устройстве FACSarray (BD Biosciences) с использованием 50 нМ FMAT 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% CO_2 и рутинно субкультивированные в MEM-среде Игла (Invitrogen), в которую были добавлены 1× заменимые аминокислоты, 0,15% бикарбонат натрия, 1 мМ пируват натрия и 15% фетальная бычья сыворотка (Invitrogen), подвергали нуклеофекции путем электропорации (Amaxa Biosystems) в соответствии с инструкциями производителей. Трансфицированные клетки инкубировали при 37°C/5% CO_2 и через 24 ч после трансфекции проводили отбор на антибиотики путем добавления генетицина до конечной концентрации 1 мг/мл. Трансфицированные клетки культивировали и субкультивировали в течение 3-5 дней в среде для отбора и затем подвергали моноклеточному сортингу путем серийного разведения в 96-луночных планшетах. Приблизительно через две недели колонии, обнаруживающие активный рост, размножали и затем анализировали на экспрессию транскрипта CXCR2 собакоподобных обезьян. Позитивные клоны также дополнительно размножали для проведения анализа.

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

Клетки яичника китайского хомячка T-Rex (T-Rex™-CHO, Invitrogen, #R718-07) выдерживали при 37°C в виде монослойных культур в среде Хэмса F12, содержащей 2 мМ L-глутамина, в которую были добавлены 10% фетальная бычья сыворотка, не содержащая тетрациклина (FBS) (Biosera), 1% пенициллин/стрептомицин и 10 мкг/мг бластицидина. Такая 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 нук-

леофекции (набор для нуклеофекции клеточных линий T, Amaxa Biosystem, программа U-23). Трансфицированные клетки инкубировали при 37°C/5% CO_2 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 и 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, и природные внутренние цистеины в последовательности дикого типа были заменены лейциновым остатком. Эти пептиды подвергали 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	CRRTVYLTYISPVLYEDMGNNTALWC 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	EDLSNYSYSSTLPPFLLDAAPCEPES LEINK 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, и 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 адъювантом 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 полноразмерный CXCR2 человека или Δ1-17 CXCR2, экспрессированный из pVAX1 с последующим одним введением клеток млекопитающих, экспрессирующих полноразмерный CXCR2 человека. 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, амплифицировали 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 и 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_{HH}) и лигировали в соответствующие рестрикционные сайты фагмидного вектора pAX50, с получением библиотеки после электропорации в TG-1 Escherichia coli. pAX50 представляет собой экспрессионный вектор, 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 c-myc-метку и (His)6-метку, находятся в одной рамке считывания. Фагмидный вектор позволяет продуцировать фаговые частицы, экспрессирующие отдельные нанотела в виде гибридного белка с продуктом geneIII.

Таблица 6

Последовательности праймеров

ABL051	GGCTGAGCTGGGTGGTCCTGG	SEQ ID NO. 13
ABL052	GGCTGAGTTTGGTGGTCCTGG	SEQ ID NO. 14
ABL003	GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC	SEQ ID NO. 15
ABL050	CATTTGAGTTGGCCTAGCCGGCCATGGCAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGG	SEQ ID NO. 16
M13Fwd	TGTAAAACGACGGCCAGT	SEQ ID NO. 17
M13Rev	CAGGAAACAGCTATGACC	SEQ ID NO. 18
Rev_30GlySer	TCAGTAACCTGGATCCCCCGCCACCGCTGCCTCCACCGCCGCTACCCCCGCCACCG CTGCCTCCACCGCCTGAGGAGACGGTGACCTG	SEQ ID NO. 19
For_GlySer35	AGGTTACTGAGGATCCGGCGGTGGAGGCAGCGGAGGTGGGGGCTCTGGTGGCGG GGGTAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG	SEQ ID NO. 20
Fwd-EVQL-MfeI	GAGGTGCAATTGGTGGAGTCTGGG	SEQ ID NO. 21
Rev-TVSS-BstEII	TGAGGAGACGGTGACCTGGGTCCC	SEQ ID NO. 22
Fwd-EVQL-BamHI	TCTTGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGG	SEQ ID NO. 23
Rev-TVSS-BspEI	ACCGCCTCCGGAGGAGACCGTGACCTGGGTCCC	SEQ ID NO. 24

7. Отбор.

Указанные выше pAX50-библиотеки нанотел, экспрессированные на поверхности бактериофагов, отбирали с использованием пептидов, мембранных экстрактов и цельных клеток, презентирующих 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 и 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) и 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 негативного 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 и 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 и 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 и 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 и 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 FACSarray (BD Biosciences). В табл. 7 представлен список нанотел, периплазматические экстракты которых конкурируют с Gro-α за связывание с CXCR2 человека.

Таблица 7

Конкурентное связывание с Gro-α за связывание с CXCR2 человека (периплазматические экстракты)

Название	FACS-анализ на конкуренцию 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 человеческим пептидом из 1-19 аминокислотных остатков с помощью ELISA. Планшеты MaxiSorb (Nunc, 430341) покрывали в течение 2 ч нейтравидином и затем блокировали в течение 1 ч (PBS, 1% казеином). Затем в эти планшеты в течение 1 ч добавляли 100 нМ биотинилированного человеческого пептида 1-19 (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) и связанные нанотела детектировали с использованием мышиного анти-myc антитела (Roche, 11667149001) и затем ПХ-конъюгированного кроличьего антимышиного антитела (Dakocytomation, P0260). В табл. 8 систематизированы отношения сигнала связывания анти-CXCR2 нанотел Nanobodies 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

10. Последовательности.

Таблица 9

Последовательности моновалентных анти-CXCR2 нанотел

143B03	SEQ ID NO. 25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYWMYWVRQAPGKGLDWVSAIN AGGDSTYYADPVKGRFTISRDNNKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCATVRGTAR DLDYWGQGTQVTVSS
139D05	SEQ ID NO. 26	EVKLVESGGGLVQAGGSLRLSCALSGRIGSINAMGWYRQVSGQQR ELVAVSRSGGSTDIADSVKGRFTISRDNGKNTVYLQMDSLKPEDTAV YYCYAHTSSYSNWRVYNNDYWGQGTQVTVSS
146A06	SEQ ID NO. 27	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLTCAASGRIGTINAMGWYRQAPGKQR ELVAVITSGGRIDYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVY YYNVETVVGAVYWGQGTQVTVSS
147A01	SEQ ID NO. 28	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRMGNINAMGWYRQAPGKER ELVAKITRGGAITYADSVKGRFTIARDNILNTAYLQMNDLKPEDTAVYY YNVDGGPSQNYWGQGTQVTVSS
145C09	SEQ ID NO. 29	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQAPGKERE RVSCISGSDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAV YYCAAYWGLTLRLWMPPHRYDYWGQGTQVTVSS
145D03	SEQ ID NO. 30	EVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCAASGLIFRLSGMAWYRQAPGRQR EWVAVLTKDGTLHYADPVKGRFTISRNNAENTWYLQMNSLKPEDTAI YYCNTGRYWGQGTQVTVSS
144D01	SEQ ID NO. 31	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGTIGTIRAMGWYRQAPGKQRE LVALITSTGRINYADSVKGRFTIGRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYY YNIETLRRNYWGQGTQVTVSS
139H02	SEQ ID NO. 32	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYAMGWFRQATGKEREFVAAI NKSGGNTHYAGSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPRDTAVYYCAASRTN PKPDYWGQGTQVTVSS
139A08	SEQ ID NO. 33	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFSRSAMGWLRQAPGKEREFVAG ISWGGDNSYYADSVKGRFTISRDNAKNTVSLQMNSLKPQDTAVYYCAARYR GGAAVAGWEYWGQGTQVTVSS
137A08	SEQ ID NO. 34	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTLAYYTVGWFRRAPGKEREGISCIS SSDGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADRRTD CKKGRVGSGSWGQGTQVTVSS
143A05	SEQ ID NO. 35	KVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFNYYVMAWFRQAQGKEREFVAAI STRGSMTKYSDSVQGRFTISRDNAKNTVYLHMNSLKPEDTAVYYCAADPRG SSWSFSSGGYDYWGQGTQVTVSS
137B07	SEQ ID NO. 36	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGPGKAREWVAGI NSDGTTNYADPVKGRFTISRDNAKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYCASGKYRGQ GTQVTVSS
127D01	SEQ ID NO. 37	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFDFKVMGWYRQPPGKQREGVAA IRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQ DYWGQGTQVTVSS
126B11	SEQ ID NO. 38	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGSSFRINTMGWYRRAPGKQRELVAAR DRGGYINYVDSVKGRFTVSRDNAKPTMYLQMNSLKPEDTAVYYCHAGTQDR TGRNFDHWGQGTQVTVSS
097A09	SEQ ID NO. 39	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQRELVADIT SGGNINYIDAVKGRFTISRDNTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNAEIVVLVGV WTQRARTGNYWGQGTQVTVSS
159B10	SEQ ID NO. 40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSLSMGWFRQAPGKERAFVAA LTRNGGYRYYADSVKGRFTISRDVAKKTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAADSLS GSDYLGTNLDYWGQGTQVTVSS
163D02	SEQ ID NO. 41	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAI TWNGGRVFYTASVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDR RTDYLGHPVAYWGQGTQVTVSS
163E03	SEQ ID NO. 42	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAI TWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGS SWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
2B2	SEQ ID NO .43	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQRELVVRR TRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCMLDDRGGV YWGQGTQVTVSS
54B12	SEQ ID NO. 90	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQRELVAAR DRGGYINYVDSVKGRFTVSRDNAKPTMYLQMNSLKPEDTAVYYCHAGTQDR TGRNFDRWGQGTQVTVSS

Примеры характеризации моновалентных нанотел

11. Конструирование моновалентных нанотел.

Нанотела, содержащие ДНК-фрагменты, полученные с помощью ПЦР на функциональных фагмидных клонах с использованием праймеров Fwd-EVQL-MfeI и Rev-TVSS-BstEII (табл. 1), гидролизовали ферментами MfeI и BstEII, лигировали в вектор pAX100 и трансформировали в компетентные клетки TG-1 E. coli. pAX100 представляет собой экспрессионный вектор, происходящий от плазмиды pUC119,

содержащей промотор LacZ, ген резистентности к канамицину, сайт множественного клонирования и лидерную последовательность OmpA. Кодирующая последовательность нанотела и вектор, кодирующий С-концевую c-myc-метку и His6-метку, находятся в одной рамке считывания. Клоны, резистентные к канамицину, анализировали на присутствие вставки и затем подтверждали последовательности позитивных клонов.

12. Экспрессия в лабораторном масштабе.

Клетки TG-1, содержащие экспрессионные векторы, 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°С. После сбора клеток получали периплазматические экстракты, и His6-меченные нанотела очищали с аффинной хроматографией на колонке с иммобилизованным металлом (HisTrap FF Crude, GE Healthcare) и затем обессоливали (HiPrep 26/10, GE Healthcare) или подвергали гель-фильтрации (Superdex 75 HR16/10, GE Healthcare) в PBS.

13. Анализ на конкурентное связывание с лигандом.

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

Таблица 10

Активность в конкурентном связывании моновалентных анти-CXCR2 нанотел с лигандами

	CXCR2 человека		CXCR2 собакоподобных обезьян	
	IC50 (M)	% ингибирования (макс.)	IC50 (M)	% 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 калвция (FLIPR).

Эритроциты (RBL), экспрессирующие рецептор CXCR2 человека или рецептор CXCR2 собакоподобных обезьян, высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи при 37°С. В день проведения эксперимента в клетки вводили краситель Fluo-4 и оставляли на 30 мин при 37°С и затем подвергали 30-минутному инкубированию с очищенными моновалентными анти-CXCR2 нанотелами. И, наконец, добавляли Gro-α на планшет-ридере для флуориметрической визуализации (FLIPR), 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 IC_{50} 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 [^{35}S]GTPγS.

Очищенные моновалентные анти-CXCR2 нанотела инкубировали в течение 60 мин с Gro-α, GDP, SPA-сферами и с CHO-CXC2-мембранами, выделенными из клеток CHO, экспрессирующих рецептор CXCR2 человека, в 96-луночном планшете. Затем добавляли [^{36}S]GTPγS и инкубировали еще 60 мин. И наконец, планшет центрифугировали и затем считывали на Topcount. Сумма средних значений IC_{50} указана в табл. 11.

Таблица 11

Величины IC_{50} для очищенных моновалентных анти-CXCR2 нанотел® в функциональных анализах, проводимых с использованием рекомбинантных клеточных линий

	FLIPR				$[^{35}S]GTP\gamma S$	
	CXCR2 человека		CXCR2 собакоподобных обезъян		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 тестрирумых 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 целвной крови человека (hWBSC).

Донорами были здоровые добровольцы, которые не подвергались системной терапии (группа доноров, Novartis Horsham). Цельную кровь, которую обрабатывали антикоагулянтом, а именно 52 мМ 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 EC_{70} 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 и затем во все пробирки добавляли 1,4 мл 1× раствора хлорида аммония для лизиса и эти пробирки оставляли на льду еще на 20 мин. После лизиса эритроцитов образцы анализировали на проточном цитометре FACSCaiibur (Becton Dickinson). Популяции клеток были идентифицированы по дискриминационному окну прямого рассеяния/бокового рассеяния (FSC/SSC), и 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 мМ 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 и 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 2e^6/мл. Ми-

грацию оценивали на планшетах Transwell, содержащих 3 мкм PET-мембран от Becton Dickinson. Кратко, перед помещением вставок для многолучночного планшета в нижнее положение на дно лунок планшета (1000 мкл/лунка) добавляли 6 нМ Gro-α (EC_{80}-EC_{100}),и затем на эти вставки добавляли МКПК (500 мкл/лунка), которые были предварительно инкубированы с различными концентрациями нанотела (0,13-1000 нМ для моновалентных 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 (CynoWBSC).

Венозную кровь, взятую либо из предплечья, либо из нижней конечности, обрабатывали антикоагулянтом, а именно 3,8% цитратом 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} мкМ); при этом во все лунки добавляли 10 мкл rhGROa (приблизительная концентрация EC_{70-90} 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 и 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 FACSCaiibur (Becton Dickinson). Популяции клеток были идентифицированы по дискриминационному окну прямого рассеяния/бокового рассеяния (FSC/SSC), и 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 IC_{50} для очищенных моновалентных анти-CXCR2 нанотел в функциональных анализах, проводимых с использованием первичных нейтрофилов и rhGROα

	WBSC человека IC_{50} (нМ)	WBSC собакоподобных обезьян IC_{50} (нМ)	Хемотаксис у человека IC_{50} (нМ)
163D2	6,6±3,1	>100	ND
127D1	4,9±2,9	>100	14±9,4
97A9	11,6±5,47	>100	48,5±31
163E3	9,4±6,2	>100	9,3±4
54B12	19,7	>100	ND
2B2	29,5±23,4	>100	212±121

Мультивалентные нанотела

16. Конструирование двухвалентных нанотел.

Для конструирования двухвалентных нанотел были применены два подхода.

ПЦР-амплификацию проводили на плазмидной ДНК, кодирующей моновалентные структурные элементы. N-концевой структурный элемент амплифицировали с использованием Fwd-EVQL-MfeI и обратного праймера, кодирующего часть линкера GlySer, и С-концевой структурный элемент амплифицировали с использованием прямого праймера, кодирующего остальную часть линкера GlySer и Rev-TVSS-BstEII (табл. 6). N-концевой фрагмент гидролизовали ферментами MfeI и BamHI, и С-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 моновалентные структурные элементы. N-концевой структурный элемент амплифицировали с использованием Fwd-EVQL-MfeI и Rev-TVSS-BspEI и С-концевой структурный элемент амплифицировали с использованием Fwd-EVQL-BamHI и Rev-TVSS-BstEII (табл. 6). N-концевой фрагмент гидролизовали ферментами MfeI и BamHI и С-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 С-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 после-

довательности позитивных клонов.

17. Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел.

Таблица 13

CXCR20011	**97A9-35GS-97A9** SEQ ID NO. 44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNA EIVVLVGVWTQRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASG SIVRINTMGWYRQTPGKQRELVADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNTKN TVYLQMNSLKPEDTAVYYCNAEIVVLVGVWTQRARTGNYWGQGTQVT VSS
CXCR20012	**137B7-35GS-137B7** SEQ ID NO. 45	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGPGKAREW VAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNAKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYCA SGKYRGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGP GKAREWVAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNAKNTIYLHMDMLKPED TAVYYCASGKYRGQGTQVTVSS
CXCR20013	**2B2-35GS-97A9** SEQ ID NO. 46	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQRELV VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWY RQTPGKQRELVADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNTKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCNAEIVVLVGVWTQRARTGNYWGQGTQVTVSS
CXCR20014	**97A9-35GS-2B2** SEQ ID NO. 47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNA EIVVLVGVWTQRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASG SILTINAMGWYRQAPGKQRELVVRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAK KTMYLQMNSLKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
CXCR20015	**2B2-35GS-137B7** SEQ ID NO. 48	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQRELV VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWT RQGPGKAREWVAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNAKNTIYLHMDML KPEDTAVYYCASGKYRGQGTQVTVSS
CXCR20016	**137B7-35GS-2B2** SEQ ID NO. 49	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGPGKAREW VAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNAKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYCA SGKYRGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAP GKQRELVVRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPED TAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
CXCR20017	**97A9-35GS-137B7** SEQ ID NO. 50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNA EIVVLVGVWTQRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGI IFRLSALGWTRQGPGKAREWVAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNAK NTIYLHMDMLKPEDTAVYYCASGKYRGQGTQVTVSS
CXCR20018	**137B7-35GS-97A9** SEQ ID NO. 51	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGPGKAREW VAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNAKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYCA SGKYRGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTP GKQRELVADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNTKNTVYLQMNSLKPEDTA VYYCNAEIVVLVGVWTQRARTGNYWGQGTQVTVSS

CXCR20019	**2B2-9GS-2B2** SEQ ID NO. 52	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQRELV VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGELVQPGGS LRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQRELVVRRTRGGSTTYQDSVKG RFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTV SS
CXCR20020	**127D1-35GS-163D2** SEQ ID NO. 53	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFDFKVMGWYRQPPGKQRE GVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYY CKVNIRGQDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAM GWFRQAPGKEREFVAAITWNGGRVFYTASVKGRFTISRDNAKNTMYL QMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHPVAYWGQGTQVTVSS
CXCR20021	**127D1-35GS-163E3** SEQ ID NO. 54	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFDFKVMGWYRQPPGKQRE GVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYY CKVNIRGQDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAM GWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNAKNTVYL QMNSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
CXCR20022	**163D2-35GS-163D2** SEQ ID NO. 55	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKERE FVAAITWNGGRVFYTASVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS GRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGGRVFYTASVKGRFTISR DNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHPVAYWGQGT QVTVSS
CXCR20023	**163D2-35GS-163E3** SEQ ID NO. 56	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKERE FVAAITWNGGRVFYTASVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS GRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTV SS
CXCR20024	**163E3-35GS-163E3** SEQ ID NO. 57	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREF VAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVY YCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRI FSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
CXCR20025	**163D2-35GS-127D1** SEQ ID NO. 58	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKERE FVAAITWNGGRVFYTASVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAAS GSTFDFKVMGWYRQPPGKQREGVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKA NAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQVTVSS
CXCR20026	**163E3-35GS-127D1** SEQ ID NO. 59	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREF VAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVY YCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGST FDFKVMGWYRQPPGKQREGVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAK NTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQVTVSS
CXCR20027	**163E3-35GS-163D2** SEQ ID NO. 60	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREF VAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVY YCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGR TFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGGRVFYTASVKGRFTISRDNA KNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHPVAYWGQGTQVTV SS

CXCR20028	**97A9-35GS-54B12** SEQ ID NO. 61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNA EIVVLVGVWTQRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSG STFRINTMGWYRRAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDN AKPTMYLQMNSLKPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFDRWGQGTQVTVS S
CXCR20029	**163E3-35GS-54B12** SEQ ID NO. 62	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREF VAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVY YCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGST FRINTMGWYRRAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDNAK PTMYLQMNSLKPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFDRWGQGTQVTVSS
CXCR20030	**163D2-35GS-54B12** SEQ ID NO. 63	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKERE FVAAITWNGGRVFYTASVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVS GSTFRINTMGWYRRAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRD NAKPTMYLQMNSLKPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFDRWGQGTQVTV SS
CXCR20031	**2B2-35GS-163E3** SEQ ID NO. 64	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQRELV VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGW FRQAPGKEREFVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
CXCR20032	**2B2-35GS-163D2** SEQ ID NO. 65	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQRELV VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMG WFRQAPGKEREFVAAITWNGGRVFYTASVKGRFTISRDNAKNTMYLQ MNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHPVAYWGQGTQVTVSS
CXCR20033	**163E3-35GS-2B2** SEQ ID NO. 66	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREF VAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVY YCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSI LTINAMGWYRQAPGKQRELVVRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKK TMYLQMNSLKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
CXCR20034	**163D2-35GS-2B2** SEQ ID NO. 67	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKERE FVAAITWNGGRVFYTASVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAAS GSILTINAMGWYRQAPGKQRELVVRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIA KKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
CXCR20035	**54B12-35GS-163E3** SEQ ID NO. 68	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQREL VAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDNAKPTMYLQMNSLKPEDTAVYYC HAGTQDRTGRNFDRWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFS SNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNAK NTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
CXCR20036	**54B12-35GS-163D2** SEQ ID NO. 69	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQREL VAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDNAKPTMYLQMNSLKPEDTAVYYC HAGTQDRTGRNFDRWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS DYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGGRVFYTASVKGRFTISRDNAKN TMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHPVAYWGQGTQVTVSS

18. Анализ на конкурентное связывание с лигандами.

Мультивалентные анти-CXCR2 нанотела титровали против 3 нМ FMAT-Blue-меченного Gro-α в FACS-анализе на конкурентное связывание CXCR2 человека и CXCR2 собакоподобных обезьян с лигандом (табл. 14). Для CXCR2 человека блокирующая активность составляла в интервалах между удвоенными нМ-величинами и суб-нМ-величинами, и для CXCR2 собакоподобных обезьян эта активность составляла в интервалах между величиной нМ и удвоенной величиной нМ.

Таблица 14

Анализ на конкурентное связывание мультивалентных анти-CXCR2 нанотел с лигандами

		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	97A9-3SGS-S4B12	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 калвция (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 и 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), 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 CEM, эндогенно экспрессирующих CXCR4 человека, и SDF-1 в качестве агониста, при этом протокол анализа был аналогичен протоколу анализа, описанного для CXCR2. Сумма средних величин IC_{50} 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 [^{35}S]GTPγS.

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 [^{36}S]GTPγS и инкубировали еще 60 мин. И наконец, планшет центрифугировали и затем считывали на Topcount. Сумма средних значений IC_{50} указана в табл. 15.

Таблица 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 обезъян	
		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	152E-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 тестрирумых концентрациях плато не наблюдалось.

ND - не определяли.

Таблица 16

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

		CXCR2 человека (с использованием различных агонистов)					
		GRO-a		IL-8		ENA-78	
		IC_{50} (M)	% ингибирования (макс.)	IC50 (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]GTPγS. Формат этого анализа позволяет уравновешивать агонист и нанотело перед добавлением [^{35}S]GTPγS, 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 моновалентных 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.

Моновалентные 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(а)). 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 максималь-

ного 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)). Также были протестированы бипаратопные нанотела 127D1-163E3, 127D1-163D2 и 54B12-163D2, и было обнаружено, что они обладают аналогичными свойствами (данные не приводятся).

Свойства, проиллюстрированные на фиг. 1, также аналогичны свойствам, проиллюстрированным на фиг. 2, что указывает на то, что, как показал анализ на способность ингибировать Gro-α, репрезентативная связывающая молекула 127D1 является активной, но не эффективной, тогда как другая связывающая молекула 63E3 является менее активной, но более эффективной чем 127D1. Очевидно, что при объединении этих двух связывающих молекул, полученная бипаратопная связывающая молекула является активной и эффективной. В заключение можно отметить, что бипаратопные молекулы по изобретению являются более эффективными и активными, чем мономерные нанотела. Величины IC_{50} представлены в таблице, приведенной ниже.

Нанотело	IC50 (M) при соответствующей концентрации (нМ) Gro-α			
	5	15	45	150
127D1	1,642E-09	2,045E-09	3,264E-09	4,602E-09
163E3	3,031E-08	4,044E-08	7,543E-08	1,868E-07
163E3-127D1	6,532E-10	1,983E-09	1,614E-08	6,713E-08

В настоящее время аллостерический модулятор определяют как модулятор, который связывается в сайте, отличающемся от сайта связывания агониста (ортостерического лиганда), и это означает, что ортостерический лиганд и аллостерический модулятор связываются с рецептором одновременно. В настоящее время авторы настоящего изобретения не располагают данными, подтверждающими этот факт, и 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 проводили методами, описанными в разделе 15.

Таблица 17

Величины IC_{50} для очищенных бипаратопных анти-CXCR2 нанотел в функциональных анализах, проводимых с использованием первичных нейтрофилов человека или собакоподобных обезьян (и rhGROα, среднее±ср.кв.от.)

	WBSC человека IC_{50} (нМ)	WBSC собакоподобных обезьян IC_{50} (нМ)	Хемотаксис у человека IC_{50} (нМ)
97A9-2B2	0,445±0,08	0,16±0,16	0,16±0
163D2-2B2	0,29±0,17	0,44±0,14	0,143±0,003
163E3-2B2	0,345±0,15	0,42±0,12	0,15±0,02
127D1-163D2	0,17	0,12±0,09	0,143±0,009
163E3-127D1	0,165±0,06	0,26±0,25	0,14±0,006
97A9-54B12	0,43±0,18	1,72±0,43	ND
163D2-54B12	0,215±0,02	0,56±0,46	ND
54B12-163E3	0,24±0,155	0,43±0,38	ND

Таблица 18

143B03	SEQ ID NO:192	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTC AGTACCTACTGGATGTATTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGG GCTCGACTGGGTCTCAGCTATTAATGCTGGTGGTGATAGCACAT ACTATGCAGACCCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGAC AACAACAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAACC TGAGGACACGGCCCTGTATTACTGTGCGACCGTACGAGGCACA GCTCGTGACTTGGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCG TCTCCTCA
139D05	SEQ ID NO:193	GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCACTCTCTGGAAGGATCGGC AGTATCAACGCCATGGGCTGGTATCGCCAGGTTTCAGGACAACA GCGCGAGTTGGTCGCAGTAAGCAGGAGCGGAGGTAGCACAGAC ATTGCTGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA CGGCAAGAACACAGTGTATCTGCAGATGGACAGCCTGAAACCTG AGGACACGGCCGTCTATTACTGTTATGCTCATACTTCAAGCTATA GTAATTGGCGAGTCTACAATAACGACTACTGGGGCCAGGGGACC CAGGTCACCGTCTCCTCA
146A06	SEQ ID NO:194	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTTACCTGTGCAGCCTCTGGACGCATCGG CACTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAG CAGCGCGAGTTGGTCGCAGTTATTACTAGTGGTGGTAGGATAGA CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACA ATGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCT GAGGACACGGCCGTCTATTACTATAATGTAGAAACGGTAGTGGG TGCCGTCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
147A01	SEQ ID NO:195	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGGATGGG CAATATCAATGCCATGGGCTGGTATCGCCAGGCTCCAGGGAAGG AGCGCGAGTTGGTCGCAAAAATTACTAGGGGTGGTGCGATAACC TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCGCCAGAGACAA TATTCTGAACACGGCGTATCTGCAAATGAACGACCTGAAACCTGA GGACACGGCCGTCTATTATTATAATGTAGATGGGGGGCCCAGTC AAAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
145C09	SEQ ID NO:196	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTC GATGATTATGCCATAGGCTGGTTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGG AGCGTGAGAGGGTCTCATGTATTAGTGGTAGTGATGGTAGCACA TACTATGCAGACTCCGTCAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGTGA CAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAAC CCGAGGACACGGCCGTTTATTATTGTGCAGCATATTGGGGACTA ACGCTCAGGCTATGGATGCCCCCCCACCGGTATGACTACTGGG GCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
145D03	SEQ ID NO:197	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGCCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTTATCTTC AGACTCAGTGGCATGGCCTGGTATCGCCAGGCTCCGGGGAGGC AGCGCGAGTGGGTCGCAGTGCTTACCAAAGATGGTACCCTACAC TATGCAGACCCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAAACAA CGCCGAGAACACGTGGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG AGGACACAGCCATCTATTACTGTAATACGGGCCGTTACTGGGGC CAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
144D01	SEQ ID NO:198	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCACTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAACCATCGG CACGATCAGAGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAG CAGCGCGAGTTGGTCGCATTGATTACTAGTACTGGTAGGATAAA CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATTGGAAGAGACA ATGCCAAGAACACGGCGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAACCT GAGGACACGGCCGTCTATTACTATAATATCGAAACACTACGACGT AACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
139H02	SEQ ID NO:199	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTT AGTAACTATGCCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCCACAGGGAAGG AGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTAACAAGAGTGGTGGGAACACA CACTATGCAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGA CAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTAGGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCGTCGCGGACTAAC CCTAAGCCTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCT CCTCA
139A08	SEQ ID NO:200	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTG GGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCTCCTTC AGTCGCAGTGCCATGGGCTGGCTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG AGCGTGAATTTGTAGCAGGTATTAGCTGGGGTGGTGATAACTCA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGA CAACGCCAAGAACACCGTGTCTCTACAAATGAACAGCCTGAAAC CTCAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAAGATACCGGGGA GGCGCGGCAGTAGCTGGTTGGGAGTACTGGGGCCAGGGGACC CAGGTCACCGTCTCCTCA

137AOS	SEQ ID NO:201	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACTTTG GCCTATTATACCGTAGGCTGGTTCCGCCGGGCCCCAGGGAAGG AGCGCGAGGGGATCTCATGTATTAGTAGTAGTGATGGTAGCACA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGA CAATGCCAAGAATACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGGCTGACAGACGTACC GACTGTAAAAAGGGTAGAGTCGGTTCTGGTTCCTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
143A05	SEQ ID NO:202	AAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGGCT GGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGACGCGCCT TCAATTACTATGTCATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCAAGGGAAG GAGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTAGCACGCGTGGTAGTATGAC AAAGTATTCAGACTCCGTGCAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG ACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCACATGAACAGCCTGAAA CCTGAGGATACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAGACCCTCGCGG CAGTAGCTGGTCATTTTCGTCCGGGGGTTATGACTACTGGGGCC AGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
137B07	SEQ ID NO:203	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTGTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGAATCATCTTC AGACTCAGTGCGTTGGGTTGGACACGCCAGGGTCCAGGAAAGG CGCGCGAGTGGGTCGCAGGTATTAACAGTGATGGTACGACCAA CTACGCCGACCCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACA ACGCCAAGAACACGATATATCTGCACATGGACATGCTGAAACCT GAGGATACGGCCGTCTATTACTGTGCCTCCGGAAAGTACCGGG GCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
127D01	SEQ ID NO:204	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGAGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCACCTTC GATTTCAAAGTCATGGGCTGGTACCGCCAGCCTCCAGGGAAGCA GCGCGAGGGGGTCGCAGCGATTAGGCTTAGTGGTAACATGCAC TATGCAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAAAGCCAA CGCCAAGAACACAGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTG AGGACACGGCCGTCTATTACTGTAAGGTGAACATTCGGGGCCAG GACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
126B11	SEQ ID NO:205	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGACGCTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAAGCTCCTTC AGAATCAATACCATGGGCTGGTACCGCCGGGCTCCAGGGAAGC AGCGCGAGTTGGTCGCAGCTCGTGATAGAGGTGGTTACATAAAC TATGTAGATTCCGTGAAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGACAA CGCCAAGCCCACAATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG AGGACACGGCCGTCTATTATTGTCATGCCGGGACCCAAGATCGG ACGGGTCGGAATTTCGACCACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCA CCGTCTCCTCA
097A09	SEQ ID NO:206	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGAAGCATCGTC AGAATTAATACCATGGGCTGGTACCGCCAGACTCCAGGGAAGCA GCGCGAGTTGGTCGCAGATATTACCAGTGGTGGTAACATAAACT ATATAGACGCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAAC ACCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGA GGACACGGCCGTCTATTACTGTAATGCAGAGATCGTTGTTCTGG TGGGAGTTTGGACCCAGCGTGCGCGGACCGGCAACTACTGGGG CCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

159B10	SEQ ID NO:207	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACGTTC AGTAGCTTGTCCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGG AGCGTGCCTTTGTAGCAGCGCTTACTCGAAATGGTGGTTACAGA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGA CGTCGCCAAGAAGACCTTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCAGATAGTCTTAGT GGTAGTGACTACTTAGGAACCAACCTAGACTACTGGGGCCAGGG GACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
163D02	SEQ ID NO:208	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTG GGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTC AGTGACTATGCCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG AGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTACGTGGAATGGTGGTAGAGTA TTTTATACTGCCTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGA CAACGCCAAGAACACGATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAGATAAAGACAGA CGTACTGACTATCTAGGGCACCCCGTTGCCTACTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
163E03	SEQ ID NO:209	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCCTG GGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGACGCATCTTC AGTAGCAATGCCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG AGCGTGAGTTTGTAGCGGCCATTACCTGGAGGAGTGGCGGTAG CGCGTACTATGCAGACTCCGCGAAGGGCCGATTCACCATCTCCA GAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATTTGCAAATGAACAGCCTG AAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTATTGTGCAGCTGGTGGTAG TTCCTGGTTAAGTTTTCCGCCGGACTACTGGGGCCAGGGGACCC AGGTCACCGTCTCCTCA
2B2	SEQ ID NO:210	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGAGTTGGTGCAGCCG GGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTT AACTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAG CAGCGCGAGTTGGTAGTCCGTAGGACTAGGGGTGGTAGTACAA CGTATCAAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCGCAGAC ATTGCCAAGAAAACGATGTATCTCCAAATGAACAGCCTGAAACCT GAAGACACGGCCGTCTATTACTGTATGCTAGATGACCGTGGGGG TGTCTACTGGGGTCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
54B12	SEQ ID NO:211	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGACGCTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAAGCACCTTC AGAATCAATACCATGGGCTGGTACCGCCGGGCTCCAGGGAAGC AGCGCGAGTTGGTCGCAGCTCGTGATAGAGGTGGTTACATAAAC TATGTAGATTCCGTGAAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGACAA CGCCAAGCCCACAATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG AGGACACGGCCGTCTATTATTGTCATGCCGGGACCCAAGATCGG ACGGGTCGGAATTTCGACCGCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCA CCGTCTCCTCA

Таблица 19

Основная панель антител - CDR+FR CXCR2, пронумерованных по Кабату

	Каркасная область 1	CDR1	Каркасная область 2	CDR2	Каркасная область 3	CDR3	Каркасная обл.4
143B03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS SEQ ID NO. 70	TYWMY SEQ ID NO. 132	WVRQAPGKGLDWV S SEQ ID NO. 91	AINAGGDSTYYADPV KG SEQ ID NO. 152	RFTISRDNNKNTLYLQMNSLK PEDTALYYCAT SEQ ID NO. 111	VRGTARDLDY SEQ ID NO. 172	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
139D05	EVKLVESGGGLVQAGGSLRLS CALSGRIGS SEQ ID NO. 71	INAMG SEQ ID NO. 133	WYRQVSGQQRELV A SEQ ID NO. 92	VSRSGGSTDIADSVK G SEQ ID NO. 153	RFTISRDNGKNTVYLQMDSLK PEDTAVYYCYA SEQ ID NO. 112	HTSSYSNWRVYNNDY SEQ ID NO. 173	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
145C09	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGFTFD SEQ ID NO. 72	DYAIG SEQ ID NO. 134	WFRQAPGKERERV S SEQ ID NO. 93	CISGSDGSTYYADSV KG SEQ ID NO. 154	RFTISSDNAKNTVYLQMNNLK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 113	YWGLTLRLWMPPHRYDY SEQ ID NO. 174	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
145D03	EVQLVESGGGLVQAGGSLSLS CAASGLIFR SEQ ID NO. 73	LSGMA SEQ ID NO. 135	WYRQAPGRQREWV A SEQ ID NO. 94	VLTKDGTLHYADPVK G SEQ ID NO. 155	RFTISRNNAENTWYLQMNSLK PEDTAIYYCNT SEQ ID NO. 114	GRY SEQ ID NO. 175	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
139H02	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 74	NYAMG SEQ ID NO. 136	WFRQATGKEREFV A SEQ ID NO. 95	AINKSGGNTHYAGSV KG SEQ ID NO. 156	RFTISRDNAKNTVYLQMNSLK PRDTAVYYCAA SEQ ID NO. 115	SRTNPKPDY SEQ ID NO. 176	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
139A08	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRSFS SEQ ID NO. 75	RSAMG SEQ ID NO. 137	WLRQAPGKEREFV A SEQ ID NO. 96	GISWGGDNSYYADSV KG SEQ ID NO. 157	RFTISRDNAKNTVSLQMNSLK PQDTAVYYCAA SEQ ID NO. 116	RYRGGAAVAGWEY SEQ ID NO. 177	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
137A08	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGSTLA SEQ ID NO. 76	YYTVG SEQ ID NO. 138	WFRRAPGKEREGI S SEQ ID NO. 97	CISSSDGSTYYADSV KG SEQ ID NO. 158	RFTISRDNAKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 117	DRRTDCKKGRVGSGS SEQ ID NO. 178	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
143A05	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRAFN SEQ ID NO. 77	YYVMA SEQ ID NO. 139	WFRQAQGKEREFV A SEQ ID NO. 98	AISTRGSMTKYSDSV QG SEQ ID NO. 159	RFTISRDNAKNTVYLHMNSLK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 118	DPRGSSWSFSSGGYDY SEQ ID NO. 179	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
137B07	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLS CVASGIIFR SEQ ID NO. 78	LSALG SEQ ID NO. 140	WTRQGPGKAREWV A SEQ ID NO. 99	GINSDGTTNYADPVK G SEQ ID NO. 160	RFTISRDNAKNTIYLHMDMLK PEDTAVYYCAS SEQ ID NO. 119	GKY SEQ ID NO. 180	RGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 132
127D01	EVQLVESGGGLVQAGESLRLS CAASGSTFD SEQ ID NO. 79	FKVMG SEQ ID NO. 141	WYRQPPGKQREGV A SEQ ID NO. 100	AIRLSGNMHYAESVK G SEQ ID NO. 161	RFTISKANAKNTVYLQMNSLR PEDTAVYYCKV SEQ ID NO. 120	NIRGQDY SEQ ID NO. 181	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
126B11	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLS CAVSGSSFR SEQ ID NO. 80	INTMG SEQ ID NO. 142	WYRRAPGKQRELV A SEQ ID NO. 101	ARDRGGYINYVDSVK G SEQ ID NO. 162	RFTVSRDNAKPTMYLQMNSLK PEDTAVYYCHA SEQ ID NO. 121	GTQDRTGRNFDH SEQ ID NO. 182	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
097A09	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	INTMG	WYRQTPGKQRELV	DITSGGNINYIDAVK	RFTISRDNTKNTVYLQMNSLK	EIVVLVGVWTQRARTGNY	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	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 82	SLSMG SEQ ID NO. 144	WFRQAPGKERAFV A SEQ ID NO. 103	ALTRNGGYRYYADSV KG SEQ ID NO. 164	RFTISRDVAKKTLYLQMNSLK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 123	DSLSGSDYLGTNLDY SEQ ID NO. 184	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
163D02	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 83	DYAMG SEQ ID NO. 145	WFRQAPGKEREFV A SEQ ID NO. 104	AITWNGGRVFYTASV KG SEQ ID NO. 165	RFTISRDNAKNTMYLQMNSLK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 124	DKDRRTDYLGHPVAY SEQ ID NO. 185	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
163E03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CVASGRIFS SEQ ID NO. 84	SNAMG SEQ ID NO. 146	WFRQAPGKEREFV A SEQ ID NO. 105	AITWRSGGSAYYADS AKG SEQ ID NO. 166	RFTISRDNAKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 125	GGSSWLSFPPDY SEQ ID NO. 186	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
002B02	EVQLVESGGELVQPGGSLRLS CAASGSILT SEQ ID NO. 85	INAMG SEQ ID NO. 147	WYRQAPGKQRELV V SEQ ID NO. 106	RRTRGGSTTYQDSVK G SEQ ID NO. 167	RFTISADIAKKTMYLQMNSLK PEDTAVYYCML SEQ ID NO. 126	DDRGGVY SEQ ID NO. 187	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
146A06	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLT CAASGRIGT SEQ ID NO. 86	INAMG SEQ ID NO. 148	WYRQAPGKQRELV A SEQ ID NO. 107	VITSGGRIDYADSVK G SEQ ID NO. 168	RFTISRDNAKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYYNV SEQ ID NO. 127	ETVVGAVY SEQ ID NO. 188	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
147A01	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRMGN SEQ ID NO. 87	INAMG SEQ ID NO. 149	WYRQAPGKERELV A SEQ ID NO. 108	KITRGGAITYADSVK G SEQ ID NO. 169	RFTIARDNILNTAYLQMNDLK PEDTAVYYYNV SEQ ID NO. 128	DGGPSQNY SEQ ID NO. 189	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
144D01	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGTIGT SEQ ID NO. 88	IRAMG SEQ ID NO. 150	WYRQAPGKQRELV A SEQ ID NO. 109	LITSTGRINYADSVK G SEQ ID NO. 170	RFTIGRDNAKNTAYLQMNNLK PEDTAVYYYNI SEQ ID NO. 129	ETLRRNY SEQ ID NO. 190	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
054B12	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLS CAVSGSTFR SEQ ID NO. 89	INTMG SEQ ID NO. 151	WYRRAPGKQRELV A SEQ ID NO. 110	ARDRGGYINYVDSVK G SEQ ID NO. 171	RFTVSRDNAKPTMYLQMNSLK PEDTAVYYCHA SEQ ID NO. 130	GTQDRTGRNFDR SEQ ID NO. 191	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131

21. Оптимизация последовательности - полипептиды-антагонисты CXCR2.

Анализ на тепловой сдвиг (TSA): 5 мкл очищенного моновалентного нанотела (80 мг/мл) смешивали 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/c, после чего эти образцы охлаждали до 37°C с приращением 2,2°C/c. После термоиндуцированного развертывания белков гидрофобные "пэтчи" 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 (Tm). (Ericsson et al. 2006 (Annals of Biochemistry, 357: 289-298).

Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC): эксперименты проводили на оборудовании Auto-Cap 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 H_2O_2 в PBS в течение 4 ч при комнатной температуре и в темноте и параллельно обрабатывали контрольные образцы, но в отсутствие H_2O_2 и 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 RPC 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 человеческого VH3-23 (DP-47) и зародышевой линии JH5 (табл. 20, стр. 147). Различия в аминокислотах указанной последовательности по сравнению с последовательностью человеческой зародышевой линии обозначены буквами, и идентичные аминокислоты показаны точками. Последовательности с подчеркнутыми различиями в аминокислотах отбирали для их превращения в человеческий аналог, и другие последовательности оставались неизменными.

Очищенное моновалентное соединение получали из 2B2, CXCR20059 и CXCR20063 и затем охарактеризовывали в FACS-анализе на конкурентное связывание с лигандом 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 характеризация моновалентного 2B2 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

	Tm (°C)	FACS-анализ на конкурентное связывание с hGro-α, IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
2B2	73,7	$1,3\times10^{-09}$	$3,5\times10^{-08}$	$6,5\times10^{-07}$	$2,4\times10^{-05}$
CXCR20059	73,4	$1,5\times10^{-09}$	$1,9\times10^{-08}$	3,9×10-0^{7}	$1,9\times10^{-05}$
CXCR20063	71,9	nd	$5,4\times10^{-08}$*	$6,1\times10^{-06}$	$2,4\times10^{-05}$

Оптимизация последовательности 97A9.

Белковую последовательность родительского 97A9 сопоставляли путем выравнивания последовательности VH3-23 человека (DP-47) и зародышевой линии JH5 (табл. 22, стр. 147). Различия в аминокислотах указанной последовательности по сравнению с последовательностью человеческой зародышевой линии обозначены буквами, и идентичные аминокислоты показаны точками. Последовательности с подчеркнутыми различиями в аминокислотах отбирали для их превращения в человеческий аналог, и другие последовательности оставались неизменными.

Очищенное моновалентное соединение получали из 97A9 и CXCR20061, и затем охарактеризовывали в FACS-анализе на конкурентное связывание с лигандом 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).

Таблица 23

Функциональная характеризация моновалентного 97A9 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

	Tm (°C)	FACS-анализ на конкурентное связывание с hGro-α, IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
ID		hCXCR2 ctrl	cCXCR2 ctrl	hCXCR2	cCXCR2
97A9	76,5	$1,2\times10^{-08}$	$6,3\times10^{-08}$	$9,4\times10^{-08}$	$8,0\times10^{-07}$
CXCR20061	80,2	$1,5\times10^{-08}$	$6,2\times10^{-08}$	$6,6\times10^{-08}$	$3,5\times10^{-07}$

Оптимизация последовательности 163E3.

Белковую последовательность родительского 163E3 сопоставляли путем выравнивания последовательности VH3-23 человека (DP-47) и зародышевой линии JH5 (табл. 24, стр. 147). Различия в аминокислотах указанной последовательности по сравнению с последовательностью человеческой зародышевой линии обозначены буквами, и идентичные аминокислоты показаны точками. Последовательности с подчеркнутыми различиями в аминокислотах отбирали для их превращения в человеческий аналог, и другие последовательности оставались неизменными.

Очищенное моновалентное соединение получали из 163E3 и CXCR20076, и затем охарактеризовывали в FACS-анализе на конкурентное связывание с лигандом 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 характеризация моновалентного 163E3 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

	Tm (°C)	FACS-анализ на конкурентное связывание с hGro-α, IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
163E3	74,4	$1,0\times10^{-08}$	$2,2\times10^{-08}$	$3,5\times10^{-08}$	$1,5\times10^{-07}$
CXCR20076	77,3	$1,6\times10^{-08}$	$2,5\times10^{-08}$	$3,1\times10^{-08}$	$1,0\times10^{-07}$

Оптимизация последовательности 127D1.

Белковую последовательность родительского 127D1 сопоставляли путем выравнивания последова-

тельности VH3-23 человека (DP-47) и зародышевой линии JH5 (табл. 26, стр. 147). Различия в аминокислотах указанной последовательности по сравнению с последовательностью человеческой зародышевой линии обозначены буквами, и идентичные аминокислоты показаны точками. Последовательности с подчеркнутыми различиями в аминокислотах отбирали для их превращения в человеческий аналог, и другие последовательности оставались неизменными.

Очищенное моновалентное соединение получали из 127D1 и CXCR20079 и затем охарактеризовывали в FACS-анализе на конкурентное связывание с лигандом 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 характеризация моновалентного 127D1 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

	Tm (°C)	FACS-анализ на конкурентное связывание с hGro-α, IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
127D1	67,2	$5,5\times10^{-10}$	$6,1\times10^{-09}$	$1,5\times10^{-08}$	$1,1\times10^{-06}$
CXCR20079	68,6	$8,0\times10^{-10}$	$2,8\times10^{-09}$	$1,0\times10^{-08}$	$4,5\times10^{-07}$

Оптимизация последовательности 163D2.

Белковую последовательность родительского 163D2 сопоставляли путем выравнивания последовательности VH3-23 человека (DP-47) и зародышевой линии JH5 (табл. 28, стр. 148). Различия в аминокислотах указанной последовательности по сравнению с последовательностью человеческой зародышевой линии обозначены буквами, и идентичные аминокислоты показаны точками. Последовательности с подчеркнутыми различиями в аминокислотах отбирали для их превращения в человеческий аналог, и другие последовательности оставались неизменными.

Очищенное моновалентное соединение получали из 163D2 и CXCR20086, и затем охарактеризовывали в FACS-анализе на конкурентное связывание с лигандом 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 характеризация моновалентного 163D2 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

	Tm (°C)	FACS-анализ на конкурентное связывание с hGro-α, IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
163D2	70,7	$2,8\times10^{-09}$	$7,1\times10^{-09}$	$6,6\times10^{-08}$	$9,2\times10^{-08}$
CXCR20086	72,3	$2,0\times10^{-09}$	$4,8\times10^{-09}$	$7,3\times10^{-08}$	$8,5\times10^{-08}$

Оптимизация последовательности 54B12.

Белковую последовательность родительского 54B12 сопоставляли путем выравнивания последовательности VH3-23 человека (DP-47) и зародышевой линии JH5 (табл. 30, стр. 148). Различия в аминокислотах указанной последовательности по сравнению с последовательностью человеческой зародышевой линии обозначены буквами, и идентичные аминокислоты показаны точками. Последовательности с подчеркнутыми различиями в аминокислотах отбирали для их превращения в человеческий аналог, и другие последовательности оставались неизменными.

Очищенное моновалентное соединение получали из 54B12, CXCR20103 и CXCR2104 и затем охарактеризовывали в FACS-анализе на конкурентное связывание с лигандами 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 характеризация моновалентного 54B12 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

	Tm (°C)	FACS-анализ на конкурентное связывание с hGro-α, IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
ID		hCXCR2 ctrl	cCXCR2 Ctrl	hCXCR2	cCXCR2
54H12	64,4	nf*	$3,3\times10^{-08}$	$1,5\times10^{-07}$	$1,1\times10^{-06}$
CXCR20104	tbd	nf*	$1,3\times10^{-08}$	$5,9\times10^{-8}$	$3,5\times15^{-6}$

Таблица 20

Выравнивание последовательности нанотела 2B2 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

```
                10        20        30        40        50        60        70        80        90       101       110
Kabat#     : .........|.........|.........|.........|.........|..a......|.........|.........|..abc.....|.........|.........|...
VH3-23/JH5 : EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK------WGQGTLVTVSS
CXCR22B2   : ....V....E.............SILTIN..G.Y.....QR.L.VRRT-R....T.Q.........A.IA.K.M.....KP........MLDDRGGVY....Q.....
CXCR20059  : ........................SILTIN..G.Y.....QR.L.VRRT-R....T.Q.........A.I..K.M.....P........LLDDRGGVY..........
CXCR20063  : ........................SILTIN..G.Y.....QR.L.VRRT-R....T.Q.........A.I....M.....P........LLDDRGGVY..........


VH3-23/JH5 - SEQ ID NO. 212
```

Таблица 22

Выравнивание последовательности нанотела 97A9 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

```
                10        20        30        40        50        60        70        80        90       100       110
Kabat#     : .........|.........|.........|.........|.........|..a......|.........|.........|..abc.....|.........|abcdefghij.....|...
VH3-23/JH5 : EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK----------WGQGTLVTVSS
CXCR297A9  : ....V.................V...SIVRINT.G.Y..T...QR.L.AD.T-...NIN.I.A..........T...V.......KP........NAEIVVLVGVWTQRARTGNY.....Q.....
CXCR20061  : ........................SIVRINT.G.Y.....QR.L.AD.T-...NIN.................V........P........NAEIVVLVGVWTQRARTGNY..........
```

Таблица 24

Выравнивание последовательности нанотела 163E3 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

```
                10        20        30        40        50        60        70        80        90       100       110
Kabat#     : .........|.........|.........|.........|.........|..ab.....|.........|.........|..abc.....|.........|abcd.....|...
VH3-23/JH5 : EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISG-SGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK----------WGQGTLVTVSS
CXCR2163E3 : ....V.................V...RI...N..G.F.....ER.F.A..TWR....A.....A..........A...V.......KP........AGGSSWLSFPPDY.....Q.....
CXCR20076  : ........................RI...N..G.F.....ER.F.A..TWR....A.................V........P........AGGSSWLSFPPDY..........
```

Таблица 26

Выравнивание последовательности нанотела 127D1 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

```
                10        20        30        40        50        60        70        80        90       101       110
Kabat#     : .........|.........|.........|.........|.........|..a......|.........|.........|..abc.....|.........|.........|...
VH3-23/JH5 : EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK-------WGQGTLVTVSS
CXCR2127D1 : ....V.........A.E..........S..DFKV.G.Y..P...QR.G.A..R-LS.NMH..E.........KA.A...V........P........KVNIRGQDY.....Q.....
CXCR20079  : ........................S..DFKV.G.Y.....QR.G.A..R-LS.NRH..E.........A.....V........P........KVNIRGQDY..........
```

Таблица 28

Выравнивание последовательности нанотела 163D2 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

```
                10        20        30        40        50        60        70        80        90       100              110
Kabat#     : .........|.........|.........|.........|.........|..a......|.........|.........|..abc.....|.........|abcdefg.....|...
VH3-23/JH5 : EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK-------------WGQGTLVTVSS
CXCR2163D2 : ....V.........A.............R...D...G.F.....ER.F.A..TWN..RVF.TA.............A...M.......KP.........ADKDRRTDYLGHPVAY.....Q.....
CXCR20086  : ........................R...D...G.F.....ER.F.A..TWN..RVF.TA.....................P.........ADKDRRTDYLGHPVAY..........
```

Таблица 30

Выравнивание последовательности нанотела 54B12 и его вариантов с оптимизированной последовательностью

```
                10        20        30        40        50        60        70        80        90       100       110
Kabat#     : .........|.........|.........|.........|.........|..a......|.........|.........|..abc.....|.........|abcd.....|...
VH3-23/JH5 : EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK----------WGQGTLVTVSS
CXCR254B12 : ....V.........A....T....V...S..RINT.G.Y.R....QR.L.A.RD-R..YIN.V.........V....A.P.M.......KP........HAGTQDRTGRNFDR.....Q.....
CXCR20103  : ........................V...S..RINT.G.Y.....QR.L.A.RD-R..YIN.................P.M.........P........HAGTQDRTGRNFDR..........
CXCR20104  : ........................V...S..RINT.G.Y.....QR.L.A.RD-R..YIN.V...............P.M.........P........HAGTQDRTGRNFDR..........
```

Таблица 32

Аминокислотные последовательности вариантов с оптимизированной последовательностью

CXCR20059	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQRELVVRRTRGGSTTYQDSVK GRFTISADISKKTMYLQMNSLRPEDTAVYYCLLDDRGGVYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO. 213
CXCR20063	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQRELVVRRTRGGSTTYQDSVK GRFTISADISKNTMYLQMNSLRPEDTAVYYCLLDDRGGVYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO. 214
CXCR20061	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIVRINTMGWYRQAPGKQRELVADITSGGNINYADSVK GRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEIVVLVGVWTQRARTGNYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO. 215
CXCR20079	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDFKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLSGNRHYAESVK GRFTISRANSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO. 216
CXCR20076	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSAYYADS VKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO. 217
CXCR20086	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGGRVFYTASV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHPVAYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO. 218
CXCR20104	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSTFRINTMGWYRQAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVK GRFTISRDNSKPTMYLQMNSLRPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFDRWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO. 219

Таблица 33

Аминокислотные последовательности бипаратопного нанотела с оптимизированной последовательностью (включая HLE с Alb8)

CXCR20079-35GS-CXCR20076	SEQ ID NO. 221	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDFKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLSGNRHYAESVKGRFTISRANSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSAYYADSVKGRFTISRDNSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTLVTVSS
CXCR20079-35GS-CXCR20086	SEQ ID NO. 222	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDFKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLSGNRHYAESVKGRFTISRANSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGGRVFYTASVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHPVAYWGQGTLVTVSS
CXCR20104-35GS-CXCR20076	SEQ ID NO. 223	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSTFRINTMGWYRQAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTISRDNSKP TMYLQMNSLRPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFDRWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSAYYADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTLVTVSS
CXCR20104-35GS-CXCR20086	SEQ ID NO. 224	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSTFRINTMGWYRQAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTISRDNSKP TMYLQMNSLRPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFDRWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGGRVFYTASVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHPVAYWGQGTLVTVSS
CXCR20079-35GS-CXCR20076-35GS-Alb8	SEQ ID NO. 225	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDFKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLSGNRHYAESVKGRFTISRANSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSAYYADSVKGRFTISRDNSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRD NAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
CXCR20079-35GS-CXCR20061-35GS-Alb8	SEQ ID NO. 226	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDFKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLSGNRHYAESVKGRFTISRANSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIVRINTMGWYRQAPGKQRELVADITSGGNINYADSVKGRFTISRDNSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEIVVLVGVWTQRARTGNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGR FTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
CXCR20079-35GS-CXCR20086-35GS-Alb8	SEQ ID NO. 227	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDFKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLSGNRHYAESVKGRFTISRANSKNTV YLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGGRVFYTASVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHPVAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNA
		KTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
ALB8	SEQ ID NO. 228	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTT LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS

Таблица 34

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

	Каркасная область 1 2 3 4	CDR1	Каркасная обл. 2	CDR2	Каркасная область 3	CDR3	Каркасная обл. 4
CXCR20059	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILT SEQ ID NO. 229	INAMG SEQ ID NO. 147	WYRQAPGKQRELVV SEQ ID NO. 106	RRTRGGSTTYQDSVKG SEQ ID NO. 167	RFTISADISKKTMYLQMNSL RPEDTAVYYCLL SEQ ID NO. 238	DDRGGVY SEQ ID NO. 187	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO. 245
CXCR20063	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILT SEQ ID NO. 229	INAMG SEQ ID NO. 147	WYRQAPGKQRELVV SEQ ID NO. 106	RRTRGGSTTYQDSVKG SEQ ID NO. 167	RFTISADISKNTMYLQMNSL RPEDTAVYYCLL SEQ ID NO. 239	DDRGGVY SEQ ID NO. 187	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO. 245
002B02	EVQLVESGGRLVQPGGSLRLSCAASGSILT SEQ ID NO. 85	INAMG SEQ ID NO. 147	WYRQAPGKQRELVV SEQ ID NO. 106	RRTRGGSTTYQDSVKG SEQ ID NO. 167	RFTISADIAKKTMYLQMNSL KPEDTAVYYCML SEQ ID NO. 126	DDRGGVY SEQ ID NO. 187	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
CXCR20061	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIVR SEQ ID NO. 230	INTMG SEQ ID NO. 143	WYRQAPGKQRELVA SEQ ID NO. 234	DITSGGNINYADSVKG SEQ ID NO. 235	RFTISRDNSKNTVYLQMNSL RPEDTAVYYCNA SEQ ID NO. 240	EIVVLVGVWTQRARTGNY SEQ ID NO. 183	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO. 245
097A09	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVR SEQ ID NO. 81.	INTMG SEQ ID NO. 143	WYRQTPGKQRELVA SEQ ID NO. 102	DITSGGNINYIDAVKG SEQ ID NO. 163	RFTISRDNTKNTVYLQMNSL KPEDTAVYYCNA SEQ ID NO. 122	EIVVLVGVWTQRARTGNY SEQ ID NO. 183	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 133
CXCR20079	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFD SEQ ID NO. 231	FKVMG SEQ ID NO. 141	WYRQAPGKQREGVA SEQ ID NO. 235	AIRLSGNRHYAESVKG SEQ ID NO. 236	RFTISRANSKNTVYLQMNSL RPEDTAVYYCKV SEQ ID NO. 241	NIRGQDY SEQ ID NO. 181	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO. 245
127D01	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFD SEQ ID NO. 79	FKVMG SEQ ID NO. 141	WYRQPPGKQREGVA SEQ ID NO. 100	AIRLSGNMHYAESVKG SEQ ID NO. 161	RFTISKANAKNTVYLQMNSL RPEDTAVYYCKV SEQ ID NO. 120	NIRGQDY SEQ ID NO. 181	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
CXCR20076	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFS SEQ ID NO. 232	SNAMG SEQ ID NO. 146	WFRQAPGKEREFVA SEQ ID NO. 105	AITWRSGGSAYYADSVKG SEQ ID NO. 237	RFTISRDNSKNTVYLQMNSL RPEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 242	GGSSWLSFPPDY SEQ ID NO. 186	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO. 245
163E03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFS SEQ ID NO. 84	SNAMG SEQ ID NO. 146	WFRQAPGKEREFVA SEQ ID NO. 105	AITWRSGGSAYYADSAKG SEQ ID NO. 166	RFTISRDNAKNTVYLQMNSL KPEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 125	GGSSWLSFPPDY SEQ ID NO. 186	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
CXCR20086	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS SEQ ID NO. 233	DYAMG SEQ ID NO. 145	WFRQAPGKEREFVA SEQ ID NO. 104	AITWNGGRVFYTASVKG SEQ ID NO. 165	RFTISRDNSKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 243	DKDRRTDYLGHPVAY SEQ ID NO. 185	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO. 245
163D02	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS SEQ ID NO. 83	DYAMG SEQ ID NO. 145	WFRQAPGKEREFVA SEQ ID NO. 104	AITWNGGRVPYTASVKG SEQ ID NO. 165	RFTISRDNAKNTMYLQMNSL KPEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 124	DKDRRTDYLGHPVAY SEQ ID NO. 185	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
CXCR20104	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSTFR SEQ ID NO. 234	INTMG SEQ ID NO. 151	WYRQAPGKQRELVA SEQ ID NO. 234	ARDRGGYINYVDSVKG SEQ ID NO. 171	RFTISRDNSKPTMYLQMNSL RPEDTAVYYCHA SEQ ID NO. 244	GTQDRTGRNFDR SEQ ID NO. 191	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO. 245
054B12	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGSTFR SEQ ID NO. 89	INTMG SEQ ID NO. 151	WYRRAPGKQRELVA SEQ ID NO. 110	ARDRGGYINYVDSVKG SEQ ID NO. 171	RFTVSRDNAKPTMYLQMNSL KPEDTAVYYCHA SEQ ID NO. 130	GTQDRTGRNFDR SEQ ID NO. 191	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131

Таблица 35

Данные для CDR вариантов с оптимизированной последовательностью по Чотия

	HCDR1	HCDR2	HCDR3
CXCR20059	GSILTIN	TRGGS	DDRGGVY
CXCR20063	GSILTIN	TRGGS	DDRGGVY
CXCR20061	GSIVRIN	TSGGN	EIVVLVGVWTQRARTGNY
CXCR20079	GSTFDFK	RLSGN	NIRGQDY
CXCR20076	GRIFSSN	TWRSGGS	GGSSWLSFPPDY
CXCR20086	GRTFSDY	TWNGGR	DKDRRTDYLGHPVAY
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 792=CXCR20076.

Эпитопы для анти-CXCR2 антител RD-HBC792 (CXCR20079), RD-HBC793 (CXCR220061) 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 и затем секвенировали и его экспрессию подтверждали посредством иммунодетектиро-

вания. Оптимизация нанотела: детектирование нанотел оптимизировали 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 в трех повторах 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, и затем проводили иммунологическое окрашивание с использованием роботизированных устройств для обработки жидкостью в целях обеспечения точности результатов и высокой воспроизводимости экспериментов.

Таблица 36

Экспериментальные параметры, использованные 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°MAb мишень Концентрация Инкубирование Производитель # по каталогу	a-CXCR2 2 мкг/мл 1 час R&DSystems MAB331	a-CXCR2 3 мкг/мл 1 час R&D Systems MAB331
2°MAb мишень Концентрация Производитель # по каталогу	A-мышиное HRP 0,8 мкг/мл Jackson mmunoresearch 115-035-003	A-мышиное Dyelight 549, 3,75 мкг/мл, Jackson Immunoresearch, 115-505-003
Промывки	PBS++	PBS++
Сигнал:фон	29:1	2,2:1
% CV родительской плазмиды	4,7%	12%

Таблица 37

Экспериментальные параметры, использованные для иммунодетектирования поликлонального антитела

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 **Экспериментальные параметры**	**Иммунодетектирование поликлонального антитела**
Клетки	HEK-293T
Фиксация	4% PFA
Блокирующий буфер	10% козья сыворотка
1°PAb мишень Концентрация Инкубирование Производитель # по каталогу	a-CXCR2 разведение 1:1000 1 час Novus NBP1-49218
2°MAb мишень Концентрация Производитель # по каталогу	антикроличье антитело HRP 0,8 мкг/мл Southern Biotech 4050-05
Промывки	PBS++
Сигнал:фон	17:1
% CV	10%

Выводы: устойчивую поверхностную экспрессию и общую экспрессию детектировали для родительской конструкция дикого типа с использованием контрольного MAb 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, 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, использованные для оптимизированного анализа посредством детектирования с применением мутагенеза по методу "дробовика" в 384-луночном планшете

Экспериментальные параметры	RD-HBC792	RD-HBC793	RD-HBC794
Клетки	HEK-293T	HEK-293T	HEK-293T
Фиксация	4% PFA	4% PFA	4% PFA
Блокирующий буфер	10% козья сыворотка	10% козья сыворотка	10% козья сыворотка
1°MAb Мишень Оптимальная концентрация Инкубирование	 анти-CXCR2 1,0 мкг/мл 1 час	 анти-CXCR2 1,0 мкг/мл 1 час	 анти-CXCR2 2,0 мкг/мл 1 час
2°MAb Мишень концентрация Инкубирование Производитель Название антитела	 Анти-myc 2 мкг/мл 1 час Лаборатория Гибридома 9E10	 Анти-myc 2 мкг/мл 1 час Лаборатория Гибридома 9E10	 Анти-myc 2 мкг/мл 1 час Лаборатория Гибридома 9E10
3°MAb Мишень Концентрация Производитель # по каталогу	 антимышиное HRP 0,8 мкг/мл Jackson Immunoresearch 115-035-003	 антимышиное HRP 0,8 мкг/мл Jackson Immunoresearch 115-035-003	 антимышиное HRP 0,8 мкг/мл Jackson Immunoresearch 115-035-003
Промывки	PBS++	PBS++	PBS++
Сигнал:фон	13:1	6,9:1	20:1
% CV	7,9%	22%	13%

Оптимизированные условия анализа, определенные в настоящем описании, использовали для картирования библиотеки для CXCR2 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-CXCR2 нанотела RD-HBC792, RD-HBC793 и RD-HBC794 не содержали Fc-областей, но содержали myc-метку, поэтому была применена многостадийная стратегия детектирования, в которой использовали промежуточное мышиное анти-myc антитело (9E10) с последующим детектированием с использованием ПХ-конъюгированного антимышиного антитела.

Выводы: были определены конечные условия для иммунодетектирования и картирования эпитопов для трех анти-CXCR2 нанотел. Оптимизированные условия давали высокое отношение "сигнал:фон" и низкую изменчивость при мутагенезе, проводимом методом "дробовика", 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 эпитопов для нанотел.

Таблица 39

Идентификация ключевых остатков

ID остатка	Мутации	ID клона	Поликлональное		RDHBC792		RD HBC 793		RD HBC 794	
			Значение	Ср.кв.отк.	Значение	Ср.кв.отк.	Значение	Ср.кв.отк.	Значение	Ср.кв.отк.
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	9,4	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	6,4	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	7,6	7,1	10,1	0,7
	C39N	1099	108,7	8,8	94,4	34,9	4,7	6,7	9,2	4,4
112	W112A	318	88,2	12,9	102,8	28,7	15,5	7,4	25,4	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	26,3	8,4	33,4	10,2
	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	13,2	5,2	18,3	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	20,1	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	1,2	7,0	8,8	2,4
	C196N	1836	97,9	8,1	90,9	14,3	7,3	2,1	9,3	3,3
274	D274A	889	101,4	14,9	102,2	1,9	21,4	7,0	29,4	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	25,5	12,2	24,6	8,8
	I282N	1989	58,8	9,2	78,5	13,7	6,9	18,0	10,3	3,1
285	T285A	770	64,8	14,3	53,1	2,4	17,1	9,7	28,8	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	5,6	6,5	6,2	2,0
	C286N	2024	92,0	20,9	58,0	13,5	1,3	9,3	11,7	8,2
293	D293A	778	131,5	4,9	100,8	49,9	15,9	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 (то есть 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, 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.

23. Селективность к CXCR2 в рекомбинантных клеточных линиях.

Индуцированное агонистом высвобождение внутриклеточного кальция (FLIPR).

Для оценки селективности к CXCR2 различные очищенные моновалентные анти-CXCR2 нанотела объединяли с получением моновалентных, бивалентных или бипаратопных конструкций, в которых отдельные структурные элементы нанотела разделены линкером 35GS.

Клетки RBL, экспрессирующие рецептор CXCR2 человека, обрабатывали красителем Fluo-4 и оставляли на 30 мин при 37°C и затем подвергали 30-минутному инкубированию с очищенными моновалентными, бивалентными или бипаратопными нанотелами. И наконец, добавляли GROα на планшетридер для флуориметрической визуализации (FLIPR), 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. Репрезентативные данные представлены на фиг. 3.

24. Увеличение времени полужизни с использованием анти-HSA антитела (Alb8).

Нейтрофилы представляют собой одну из главных провоспалительных клеточных линий, участвующих в развитии воспаления и экспрессирующих высокие уровни рецепторов CXCR2, которые опосредуют хемотаксис. Изменение формы нейтрофилов после стимуляции лигандом CXCR2 (GROα) или контрольным раздражителем (FMLP) может быть количественно оценено с помощью проточной цитометрии и использовано в качестве маркера активации.

В этом исследовании определяли профиль анти-CXCR2 нанотел in vivo для оценки фармакодинамических свойств нанотела с удлиненным временем полужизни (HLE: CXCR20076-35GS-CXCR20079-Alb8 (также обозначенного 76-79-Alb8 в примерах) по сравнению с NB-NB (не-HLE: CXCR20076-35GS-CXCR20079 (также обозначенным 76-79 в примерах)). Нанотела в разовых дозах внутривенно вводили собакоподобным обезьянам в эквимолярных дозах: неудлиненное нанотело (NB-NB, 0,3 мг/кг) или нанотело, удлиненное на домен Alb8 (анти-HAS нанотело) (NB-NB-Alb8, 0,45 мг/кг), причем кровь брали до введения дозы и в различные периоды времени после введения дозы в течение 35 дней. Все конструкции полностью ингибировали изменение формы нейтрофилов цельной крови (WBSC) ex vivo, взятой при первом заборе (через 1 или 3 ч после инъекции). Предварительные данные (PD) со всей очевидностью показали, что гибрид NB-NB-Alb8 ингибирует WBSC в течение более длительного времени, а именно в течение 9 дней, тогда как не-HLE-нанотело NB-NB ингибирует WBSC в течение 30 ч.

25. Нанотела 79-76-Alb8 и 79-86-Alb8 полностью блокируют функциональную активность CXCR2.

NVP	IC_{50} (нМ) для GROα			
	CHO-hCXCR2 GTPγS	Выделенный hSCA	hWBSCA	NHP WBSC
	Среднее ±ср.кв.отк. N=3	Среднее ±ср.кв.ош. N=3	Среднее ±ср.кв.ош. N=6-12	Среднее ±ср.кв.ош. N=4
(79-76-Alb8)	2,86±0,11	0,26±0,04	0,11±0,00	0,76±0,25
(79-86-Alb8)	2,03 (n=1)	0,16±0,01	0,11±0	0,6±0,5 (ср.кв.отк., n=3)

Нанотела 79-76-Alb8-AA и 79-86-Alb8-AA являются функционально эквивалентными и полностью блокируют функцию CXCR2. Таким образом, эти антитела не изменяют своих свойств при присоединении вариантов Ala-Ala к С-концу.

NVP	IC_{50} (нМ) для GROα			
	CHO-hCXCR2 GTPγS	Выделенный hSCA	hWBSCA	NHP WBSC
	Среднее ±ср.кв.отк. N=3	Среднее ±ср.кв.отк. N=3	Среднее ±ср.кв.ош. N=6-8	Среднее ±ср.кв.ош. N=4
(79-76-Alb8-AA)	1,31±0,41	0,25±0,06	0,15±0,01	1,36±0,7
(79-86-Alb8-AA)	2,83±1,74	0,16±0,01	0,19±0,02	0,72±0,2

26. Детектирование антител IgG посредством взаимодействия с анти-CXCR2 нанотелами у здоровых волонтеров и эффект С-концевого удлинения.

Образование антител IgG, связывающихся с CXCR20079-35GS-CXCR20076 (79-76), CXCR20079-35GS-CXCR20076-ALB8 (79-76-Alb8), CXCR20079-35GS-CXCR20086 (79-86) и CXCR20079-35GS-CXCR20086-ALB8 (79-86-Alb8) в человеческой сыворотке, оценивали путем скрининга сыворотки, взятой у здоровых доноров (44 мужчин и 44 женщин), в "сэндвич"-ELIZA. Вкратце, нанотело CXCR20079-35GS-CXCR20076-ALB8 непосредственно иммобилизовали на микротитрационном планшете. Антитела против нанотела захватывали посредством иммобилизованного нанотела и детектировали с использованием антитела против IgG человека (Fc-специфического), конъюгированного с пероксидазой хрена. После инкубирования с субстратом TMB измеряли оптическую плотность (OD) окрашенного продукта ферментативной реакции на 450 нм. Антителом, используемым в качестве позитивного контроля, является анти-CXCR2 человека антитело NOV0205 (1M8) (полученное в лаборатории путем фагового представления), партия ACE00277. При этом предварительно оценивали граничное значение, поскольку этот анализ не позволяет получить достоверное средненормализованное значение OD (OD образца/OD негативного контроля). Была протестирована сыворотка, взятая у здоровых доноров, у 44 мужчин и у 44 женщин, и было обнаружено, что протестированные пробы от 50% мужчин и 61% женщин продемонстрировали реактивность с родительскими нанотелами, которая превышала предварительно определенное граничное значение, полученное для данного анализа (см. фигуру ниже).

Не ссылаясь на какое-либо объяснение, механизм или гипотезу, авторы только предполагают, что IgG взаимодействует с конформационным эпитопом в гуманизированном Vh-домене, то есть в области, которая обычно маскируется CH1-доменом в этих антителах. Для блокирования такого взаимодействия были добавлены различные С-концевые удлинения (A, AA, AS, AST, ASTKP, GGGS), и затем они были протестированы на реактивность с анти-Nb IgG и функциональную активность. Данные, представленные

на фигурах ниже, показали, что бипаратопное нанотело с пролонгированным временем полужизни, содержащее С-концевое удлинение аминокислот 79-76-Alb8-AA, значительно снижало реактивность анти-Nb IgG с 50 до 20% у мужчин и с 61 до 16% у женщин. Кроме того, С-концевые варианты с Ala-Ala, а именно 79-76-Alb8-AA и 79-86-Alb8-AA, не влияли на функциональную активность в отличие от нанотел без С-концевых удлинений, то есть 79-76-Alb8 и 79-86-Alb8, см. фиг. 4.

27. Ингибирование хемотаксиса с использованием бипаратопных нанотел против CXCR2.

Хемотаксис представляет собой направленное движение клеток по химическому градиенту концентрации. In vivo, это относится к миграции фагоцитов, таких как нейтрофилы, из кровеносных сосудов в ткани через эндотелий. Подробное описание см. в публикациях Boyden S. (1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med; 115:453-466 и Frevert C, Wong V, Goodman R, et al. (1998) Rapid fluorescence-based measurement of neutrophil migration in vitro. J. Immunol. Methods; 213 (1):41-52.

Для имитации этого процесса in vitro авторами был разработан анализ Transwell, проводимый с использованием полиэфирных 3 мкм-мембран от Becton Dickinson. Кратко, на дно лунок планшета-приемника добавляли хемокины в концентрации EC_{50} (2 нМ rhGRO-α) и затем вставку многолуночного планшета перемещали в нижнее положение. Свежие нейтрофилы человека, выделенные из периферической крови и помеченные красителем-маркером на жизнеспособность клеток, а именно кальцеином-AM, предварительно инкубировали с различными концентрациями нанотела (0,007-30 нМ) в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем клетки добавляли во вставки многолуночного планшета и инкубировали в течение 90 мин при 37°C, после чего вставку вынимали и отбрасывали. Флуоресценцию клеток, которые мигрировали в лунки планшета-приемника, измеряли на планшет-ридере BioTek Synergy при возбуждении на длине волны 485 нм и излучении на длине волны 520 нм. Анти-CXCR2 нанотело 79-76-Alb8-AA ингибировало rhGRO-α-стимулированный хемотаксис при величине IC_{50}=0,256±0,02 нМ (среднее±ср.кв.ош., n=4 донора), см. фиг. 5.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> NOVARTIS AG

<120> ПОЛИПЕПТИДЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С ХЕНОКИНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ

<130> PAT055116

<160> 248

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 360
<212> PRT
<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> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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> PRT
<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

Pro Ile Trp Ala 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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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>
<223> ПРАЙМЕР

<400> 13
ggctgagctg ggtggtcctg g 21

<210> 14
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ПРАЙМЕР

<400> 14
ggctgagttt ggtggtcctg g 21

<210> 15
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<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
tgtaaaacga cggccagt 18

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

<220>
<223> ПРАЙМЕР

<400> 18
caggaaacag ctatgacc 18

<210> 19
<211> 88
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ПРАЙМЕР

<400> 19
tcagtaacct ggatcccccg ccaccgctgc ctccaccgcc gctacccccg ccaccgctgc 60

ctccaccgcc tgaggagacg gtgacctg 88

<210> 20
<211> 84
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ПРАЙМЕР

<400> 20
aggttactga ggatccggcg gtggaggcag cggaggtggg ggctctggtg gcgggggtag 60

cgaggtgcag ctggtggagt ctgg 84

<210> 21
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ПРАЙМЕР

<400> 21
gaggtgcaat tggtggagtc 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
tcttggatcc gaggtgcagc tggtggagtc 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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<400> 25

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr 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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<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 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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<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> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<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

<210> 34
<211> 124
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<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> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<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

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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<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

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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> мультивалентные анти-CXCR2 нанотела

<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 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 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

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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> мультивалентные анти-CXCR2 нанотела

<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 Gly Ser Gly 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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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

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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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 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

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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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 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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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

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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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

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>  PRT
<213>  Искусственная последовательность

<220>
<223>  Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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 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 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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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

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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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 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> 55
<211> 283

<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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

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 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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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

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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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

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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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 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 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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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

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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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

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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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 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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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

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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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

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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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 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 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 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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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

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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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

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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательности мультивалентных анти-CXCR2 нанотел

<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 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> PRT
<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
```

<210> 71
<211> 30
<212> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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

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

<210> 78
<211> 30
<212> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FR1

<400> 85

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
20 25 30

<210> 86
<211> 30
<212> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> моновалентные анти-CXCR2 нанотела

<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

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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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

<210> 98
<211> 14
<212> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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
<212> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FR2

<400> 110

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

<210> 111
<211> 32
<212> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FR3

<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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
<212> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Ala
20 25 30

<210> 131
<211> 11
<212> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 134

Asp Tyr Ala Ile Gly
1 5

<210> 135
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 135

Leu Ser Gly Met Ala
1 5

<210> 136
<211> 5
<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 136

Asn Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 137
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 137

Arg Ser Ala Met Gly
1 5

<210> 138
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 138

Tyr Tyr Thr Val Gly
1 5

<210> 139
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 139

Tyr Tyr Val Met Ala
1 5

<210> 140
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 140

Leu Ser Ala Leu Gly
1 5

<210> 141
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 141

Phe Lys Val Met Gly
1 5

<210> 142
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 142

Ile Asn Thr Met Gly
1 5

<210> 143
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 143

Ile Asn Thr Met Gly
1 5

<210> 144
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 144

Ser Leu Ser Met Gly
1 5

<210> 145
<211> 5
<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 145

Asp Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 146
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 146

Ser Asn Ala Met Gly
1 5

<210> 147
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 147

Ile Asn Ala Met Gly
1 5

<210> 148
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 148

Ile Asn Ala Met Gly
1 5

<210> 149
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 149

Ile Asn Ala Met Gly
1 5

<210> 150
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 150

Ile Arg Ala Met Gly
1 5

<210> 151
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 151

Ile Asn Thr Met Gly
1 5

<210> 152
<211> 17
<212> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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

<210> 156
<211> 17
<212> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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

<210> 171
<211> 16
<212> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3

<400> 175

Gly Arg Tyr
1

<210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3

<400> 176

Ser Arg Thr Asn Pro Lys Pro Asp Tyr
1 5

<210> 177
<211> 13
<212> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3

<400> 180

Gly Lys Tyr
1

<210> 181
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3

<400> 181

Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr
1 5

<210> 182
<211> 12
<212> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3

<400> 187

Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr
1 5

<210> 188
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3

<400> 188

Glu Thr Val Val Gly Ala Val Tyr
1 5

<210> 189
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3

<400> 189

Asp Gly Gly Pro Ser Gln Asn Tyr
1 5

<210> 190
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3

<400> 190

Glu Thr Leu Arg Arg Asn Tyr
1 5

<210> 191
<211> 12
<212> PRT
<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 tggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctgggggggtc tctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctactgga tgtattgggt ccgtcaggct 120

ccagggaagg ggctcgactg ggtctcagct attaatgctg gtggtgatag cacatactat 180

gcagaccccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acaacaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgaa acctgaggac acggccctgt attactgtgc gaccgtacga 300

ggcacagctc gtgacttgga ctactggggc caggggaccc aggtcaccgt ctcctca 357

<210> 193
<211> 369
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОНОВАЛЕНТНОЕ НАНОТЕЛО

<400> 193
gaggtgaagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctgggggggtc tctgagactc 60

tcctgtgcac tctctggaag gatcggcagt atcaacgcca tgggctggta tcgccaggtt 120

tcaggacaac agcgcgagtt ggtcgcagta agcaggagcg gaggtagcac agacattgct 180

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg gcaagaacac agtgtatctg 240

cagatggaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt actgttatgc tcatacttca 300

agctatagta attggcgagt 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 tggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctgggggggtc tctgagactt 60

acctgtgcag cctctggacg catcggcact atcaatgcca tgggctggta ccgccaggct 120

ccagggaagc agcgcgagtt ggtcgcagtt attactagtg gtggtaggat agactatgca 180

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac ggtgtatctg 240

caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt actataatgt agaaacggta 300

gtgggtgccg tctactgggg ccaggggacc caggtcaccg tctcctca 348

<210> 195
<211> 348
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОНОВАЛЕНТНОЕ НАНОТЕЛО

<400> 195
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctgggggggtc tctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggaag gatgggcaat atcaatgcca tgggctggta tcgccaggct 120

ccagggaagg agcgcgagtt ggtcgcaaaa attactaggg gtggtgcgat aacctatgca 180

gactccgtga agggccgatt caccatcgcc agagacaata ttctgaacac ggcgtatctg 240

caaatgaacg acctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt attataatgt agatgggggg 300

cccagtcaaa actactgggg ccaggggacc caggtcaccg tctcctca 348

<210> 196
<211> 378
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОНОВАЛЕНТНОЕ НАНОТЕЛО

<400> 196
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctgggggggtc tctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcgat gattatgcca taggctggtt ccgccaggcc 120

ccagggaagg agcgtgagag ggtctcatgt attagtggta gtgatggtag cacatactat 180

gcagactccg tcaagggccg attcaccatc tccagtgaca acgccaagaa cacggtgtat 240

ctgcaaatga acaacctgaa acccgaggac acggccgttt attattgtgc agcatattgg 300

ggactaacgc tcaggctatg gatgcccccc caccggtatg actactgggg ccaggggacc 360

caggtcaccg tctcctca 378

<210> 197
<211> 333
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОНОВАЛЕНТНОЕ НАНОТЕЛО

<400> 197
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctgggggggtc tctgagcctc 60

tcctgtgcag cctctggact tatcttcaga ctcagtggca tggcctggta tcgccaggct 120

ccggggaggc agcgcgagtg ggtcgcagtg cttaccaaag atggtaccct acactatgca 180

gaccccgtga agggccgatt caccatctcc agaaacaacg ccgagaacac gtggtatctg 240

caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacaca gccatctatt actgtaatac gggccgttac 300

tggggccagg ggacccaggt caccgtctcc tca 333

<210> 198
<211> 345
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОНОВАЛЕНТНОЕ НАНОТЕЛО

<400> 198
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctgggggggtc actgagactc 60

tcctgtgcag cctctggaac catcggcacg atcagagcca tgggctggta ccgccaggct 120

ccagggaagc agcgcgagtt ggtcgcattg attactagta ctggtaggat aaactatgca 180

gactccgtga agggccgatt caccattgga agagacaatg ccaagaacac ggcgtatctg 240

caaatgaaca acctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt actataatat cgaaacacta 300

cgacgtaact actggggcca ggggacccag gtcaccgtct cctca 345

<210> 199
<211> 354
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОНОВАЛЕНТНОЕ НАНОТЕЛО

<400> 199
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctgggggggtc tctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggacg cacctttagt aactatgcca tgggctggtt ccgccaggcc 120

acagggaagg agcgtgagtt tgtagcagct attaacaaga gtggtgggaa cacacactat 180

gcaggctccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacggtgtat 240

ctgcaaatga acagcctgaa acctagggac acggccgttt attactgtgc agcgtcgcgg 300

actaacccta agcctgacta ctggggccag gggacccagg tcaccgtctc ctca 354

<210> 200
<211> 366
<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОНОВАЛЕНТНОЕ НАНОТЕЛО

<400> 200
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggacg ctccttcagt cgcagtgcca tgggctggct ccgccaggct 120

ccagggaagg agcgtgaatt tgtagcaggt attagctggg gtggtgataa ctcatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa caccgtgtct 240

ctacaaatga acagcctgaa acctcaggac acggccgttt attactgtgc agcaagatac 300

cggggaggcg cggcagtagc tggttgggag tactggggcc aggggaccca ggtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 201
<211> 372
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОНОВАЛЕНТНОЕ НАНОТЕЛО

<400> 201
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctgggggggtc tctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatc cactttggcc tattataccg taggctggtt ccgccgggcc 120

ccagggaagg agcgcgaggg gatctcatgt attagtagta gtgatggtag cacatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa tacggtgtat 240

ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc ggctgacaga 300

cgtaccgact gtaaaaaggg tagagtcggt tctggttcct ggggccaggg gacccaggtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 202
<211> 375
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОНОВАЛЕНТНОЕ НАНОТЕЛО

<400> 202
aaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggg ctggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggacg cgccttcaat tactatgtca tggcctggtt ccgccaggct 120

caagggaagg agcgtgagtt tgtagcagct attagcacgc gtggtagtat gacaaagtat 180

tcagactccg tgcagggccg gttcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacggtgtat 240

ctgcacatga acagcctgaa acctgaggat acggccgttt attactgtgc agcagaccct 300

cgcggcagta gctggtcatt ttcgtccggg ggttatgact actggggcca ggggacccag 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 203
<211> 333
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОНОВАЛЕНТНОЕ НАНОТЕЛО

<400> 203
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctgggggggtc tgtgagactc 60

tcctgtgtag cctctggaat catcttcaga ctcagtgcgt tgggttggac acgccagggt 120

ccaggaaagg cgcgcgagtg ggtcgcaggt attaacagtg atggtacgac caactacgcc 180

gaccccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac gatatatctg 240

cacatggaca tgctgaaacc tgaggatacg gccgtctatt actgtgcctc cggaaagtac 300

cggggccagg ggacccaggt caccgtctcc tca 333

<210> 204
<211> 345
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОНОВАЛЕНТНОЕ НАНОТЕЛО

<400> 204
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggagtc tctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggaag caccttcgat ttcaaagtca tgggctggta ccgccagcct 120

ccagggaagc agcgcgaggg ggtcgcagcg attaggctta gtggtaacat gcactatgca 180

gagtccgtga agggccgatt caccatctcc aaagccaacg ccaagaacac agtgtatctg 240

caaatgaaca gcctgagacc tgaggacacg gccgtctatt actgtaaggt gaacattcgg 300

ggccaggact actggggcca ggggacccag gtcaccgtct cctca 345

<210> 205
<211> 360
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОНОВАЛЕНТНОЕ НАНОТЕЛО

<400> 205
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctgggggggtc tctgacgctc 60

tcctgtgcag tctctggaag ctccttcaga atcaatacca tgggctggta ccgccgggct 120

ccagggaagc agcgcgagtt ggtcgcagct cgtgatagag gtggttacat aaactatgta 180

gattccgtga agggccgatt caccgtctcc agagacaacg ccaagcccac aatgtatctg 240

caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt attgtcatgc cgggacccaa 300

gatcggacgg gtcggaattt cgaccactgg ggccagggga cccaggtcac cgtctcctca 360

<210> 206
<211> 378
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОНОВАЛЕНТНОЕ НАНОТЕЛО

<400> 206
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctgggggggtc tctgagactc 60

tcctgtgtag cctctggaag catcgtcaga attaatacca tgggctggta ccgccagact 120

ccagggaagc agcgcgagtt ggtcgcagat attaccagtg gtggtaacat aaactatata 180

gacgccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaaca ccaagaacac ggtgtatctg 240

caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt actgtaatgc agagatcgtt 300

gttctggtgg gagtttggac ccagcgtgcg cggaccggca actactgggg ccaggggacc 360

caggtcaccg tctcctca 378

<210> 207
<211> 372
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОНОВАЛЕНТНОЕ НАНОТЕЛО

<400> 207
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggagga ttggtgcagc ctgggggggtc tctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggacg cacgttcagt agcttgtcca tgggctggtt ccgccaggct 120

ccggggaagg agcgtgcctt tgtagcagcg cttactcgaa atggtggtta cagatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagacg tcgccaagaa gaccttatat 240

ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgtct attactgtgc agcagatagt 300

cttagtggta gtgactactt aggaaccaac ctagactact ggggccaggg gacccaggtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 208
<211> 372
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОНОВАЛЕНТНОЕ НАНОТЕЛО

<400> 208
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggacg caccttcagt gactatgcca tgggctggtt ccgccaggct 120

ccagggaagg agcgtgagtt tgtagcagct attacgtgga atggtggtag agtattttat 180

actgcctccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgatgtat 240

ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc agcagataaa 300

gacagacgta ctgactatct agggcacccc gttgcctact ggggccaggg gacccaggtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 209
<211> 366
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОНОВАЛЕНТНОЕ НАНОТЕЛО

<400> 209
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggagga ttggtgcagc ctgggggctc tctgagactc 60

tcctgtgtag cctctggacg catcttcagt agcaatgcca tgggctggtt ccgccaggct 120

ccagggaagg agcgtgagtt tgtagcggcc attacctgga ggagtggcgg tagcgcgtac 180

tatgcagact ccgcgaaggg ccgattcacc atctccagag acaacgccaa gaacacggtg 240

tatttgcaaa tgaacagcct gaaacctgag gacacggccg tttattattg tgcagctggt 300

ggtagttcct ggttaagttt tccgccggac tactggggcc aggggaccca ggtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 210
<211> 345
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОНОВАЛЕНТНОЕ НАНОТЕЛО

<400> 210
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggagag ttggtgcagc cgggggggtc tctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggaag catcttaact atcaatgcca tgggctggta ccgccaggct 120

ccagggaagc agcgcgagtt ggtagtccgt aggactaggg gtggtagtac aacgtatcaa 180

gactccgtga agggccgatt caccatctcc gcagacattg ccaagaaaac gatgtatctc 240

caaatgaaca gcctgaaacc tgaagacacg gccgtctatt actgtatgct agatgaccgt 300

gggggtgtct actggggtca ggggacccag gtcaccgtct cctca 345

<210> 211
<211> 360
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ МОНОВАЛЕНТНОЕ НАНОТЕЛО

<400> 211
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctgggggggtc tctgacgctc 60

tcctgtgcag tctctggaag caccttcaga atcaatacca tgggctggta ccgccgggct 120

ccagggaagc agcgcgagtt ggtcgcagct cgtgatagag gtggttacat aaactatgta 180

gattccgtga agggccgatt caccgtctcc agagacaacg ccaagcccac aatgtatctg 240

caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt attgtcatgc cgggacccaa 300

gatcggacgg gtcggaattt cgaccgctgg ggccagggga cccaggtcac cgtctcctca 360

<210> 212
<211> 109
<212> PRT
<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотные последовательности вариантов, оптимизированных по последовательностям

<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
<211> 115
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотные последовательности вариантов, оптимизированных по последовательностям

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотные последовательности вариантов, оптимизированных по последовательностям

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотные последовательности вариантов, оптимизированных по последовательностям

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотные последовательности вариантов, оптимизированных по последовательностям

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотные последовательности вариантов, оптимизированных по последовательностям

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотные последовательности вариантов, оптимизированных по последовательностям

<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

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> PRT
<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 Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser

35

<210> 221
<211> 272
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотные последовательности бипаратопных антител, оптимизированных по последовательностям

<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 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 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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотные последовательности бипаратопных антител, оптимизированных по последовательностям

<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 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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотные последовательности бипаратопных антител, оптимизированных по последовательностям

<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотные последовательности бипаратопных антител, оптимизированных по последовательностям

<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

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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотные последовательности бипаратопных антител, оптимизированных по последовательностям

<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 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 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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотные последовательности бипаратопных антител, оптимизированных по последовательностям

<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 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 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 Gly Ser Gly Gly
        275                 280                 285

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 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

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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотные последовательности бипаратопных антител, оптимизированных по последовательностям

<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 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 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        275                 280                 285

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Аминокислотные последовательности бипаратопных антител, оптимизированных по последовательностям

<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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

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

<210> 233
<211> 30
<212> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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

<210> 240
<211> 32
<212> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 246

Thr Tyr Trp Met Tyr
1 5

<210> 247
<211> 14
<212> PRT
<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> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR1

<400> 248

Ile Asn Ala Met Gly
1 5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий два антигенсвязывающих домена иммуноглобулина, где указанный полипептид направлен против хемокинового рецептора CXCR2 или связывается с этим рецептором,

где указанный первый антигенсвязывающий домен содержится в первом V_{HH}-домене или его фрагменте из одной тяжелой цепи антитела на основе тяжелой цепи, происходящего от верблюдовых, или представляет собой их гуманизированный вариант, и указанный второй антигенсвязывающий домен содержится во втором V_{HH}-домене или его фрагменте из одной тяжелой цепи антитела на основе тяжелой цепи, происходящего от верблюдовых, или представляет собой их гуманизированный вариант,

и где С-конец указанного полипептида содержит удлинение в последовательности антигенсвязывающих доменов по меньшей мере на один дополнительный аминокислотный остаток, причем указанный полипептид имеет одну из следующих структур:

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

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

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

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

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; HLE представляет собой связывающую единицу, способствующую увеличению времени полужизни in vivo, и EXT представляет собой С-концевое удлинение, выбранное из A, AA, AS, AST, ASTKP или GGGS;

и где указанный первый антигенсвязывающий домен распознает первый эпитоп на CXCR2 и способен связываться с линейным пептидом, состоящим из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, и где указанный второй антигенсвязывающий домен связывается с эпитопом во внешних петлях CXCR2 человека (аминокислотные остатки 106-120, 184-208 и 274-294 SEQ ID NO: 1).

2. Полипептид по п.1, где С-концевое удлинение состоит из двух аланиновых остатков.

3. Полипептид по любому из пп.1, 2, где в указанном первом антигенсвязывающем домене иммуноглобулина CDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 141; CDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 236, и CDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 181, и где в указанном втором антигенсвязывающем домене иммуноглобулина CDR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 146; CDR5 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 237, и CDR6 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 186.

4. Полипептид по п.3, где первый антигенсвязывающий домен выбран из SEQ ID NO: 216 или полипептида, имеющего последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 216, и второй антигенсвязывающий домен выбран из SEQ ID NO: 217 или полипептида, имеющего последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 217.

5. Полипептид по любому из пп.1, 2, включающий SEQ ID NO: 221 и С-концевое удлинение, состоящее из двух аланиновых остатков.

6. Полипептид по любому из пп.1-5, где указанный первый антигенсвязывающий домен связывается с эпитопом, содержащим аминокислоты F11, F14 и W15 SEQ ID NO: 1.

7. Полипептид по любому из пп.1-6, где указанный второй антигенсвязывающий домен связывается с эпитопом CXCR2, содержащим аминокислотные остатки W112, G115, I282 и T285 SEQ ID NO: 1.

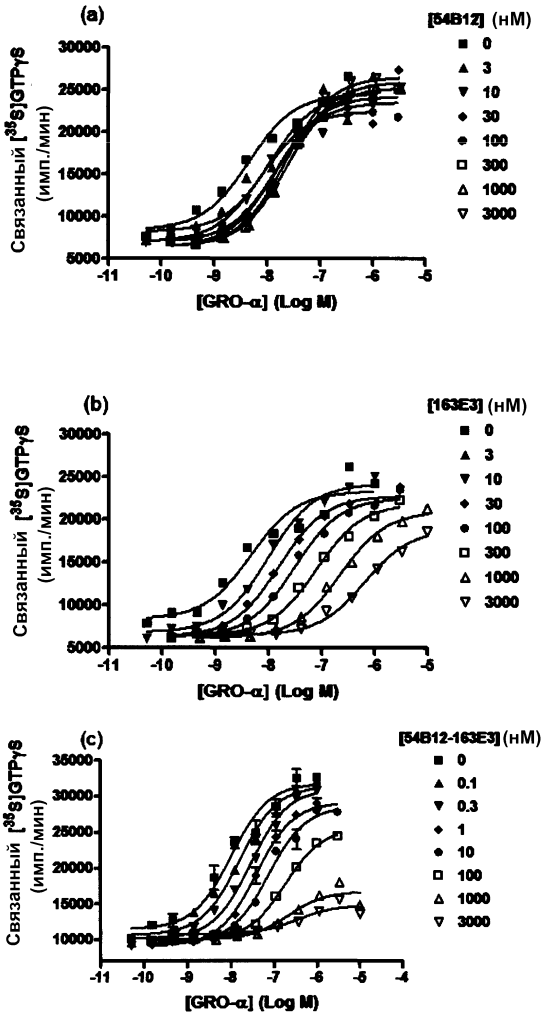
8. Полипептид по любому из пп.1-7, состоящий из последовательности SEQ ID NO: 225 с С-концевым удлинением, состоящим из двух аланиновых остатков.

9. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид по любому из пп.1-8.

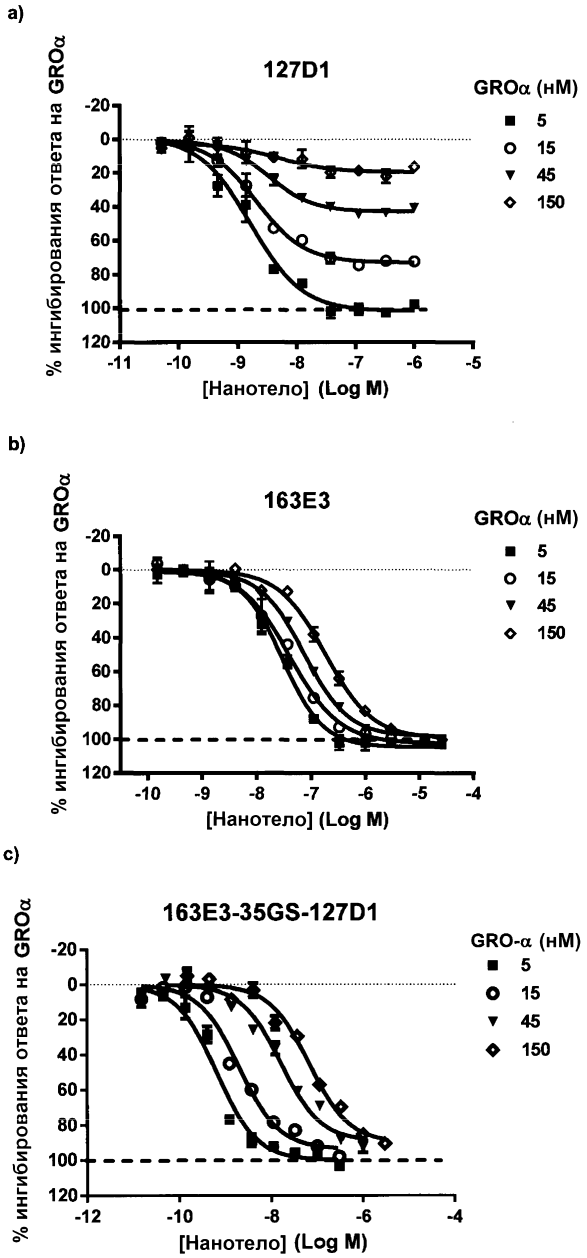
10. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из пп.1-8 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

11. Применение полипептида по любому из пп.1-8 в лечении хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и осложнений ХОБЛ.

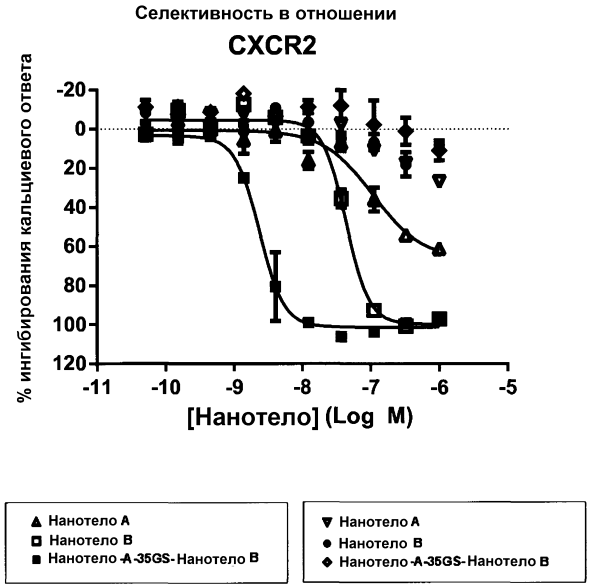
12. Применение полипептида по любому из пп.1-8 в лечении кистозного фиброза, астмы и, в частности, астмы в тяжелой форме и обострений астмы, а также острого поражения легких, острого респираторного дистресс-синдрома, идиопатического фиброза легких, ремоделирования дыхательных путей, синдрома облитерирующего бронхиолита или бронхопульмонарной дисплазии.


(a)
[54B12] (нМ)
0
3
10
30
100
300
1000
3000
Связанный [35S]GTPγS (имп./мин)
[GRO-α] (Log M)
(b)
[163E3] (нМ)
0
3
10
30
100
300
1000
3000
Связанный [35S]GTPγS (имп./мин)
[GRO-α] (Log M)
(c)
[54B12-163E3] (нМ)
0
0.1
0.3
1
10
100
1000
3000
Связанный [35S]GTPγS (имп./мин)
[GRO-α] (Log M)

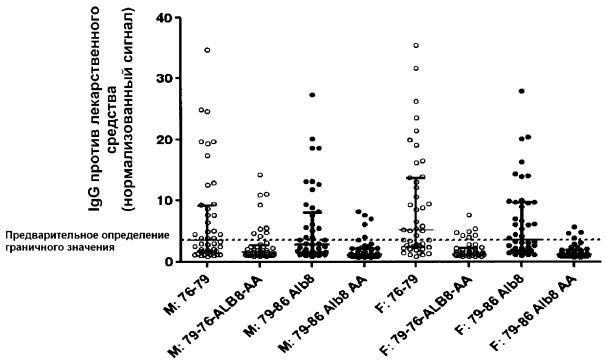
Фиг. 1


a)
127D1
GROα (нМ)
5
15
45
150
% ингибирования ответа на GROα
[Нанотело] (Log M)
b)
163E3
GROα (нМ)
5
15
45
150
% ингибирования ответа на GROα
[Нанотело] (Log M)
c)
163E3-35GS-127D1
GRO-α (нМ)
5
15
45
150
% ингибирования ответа на GROα
[Нанотело] (Log M)

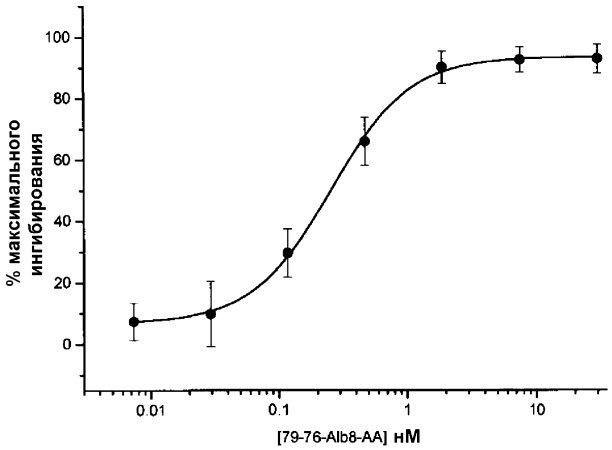
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5