



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115027** (13) **C2**  
(51) МПК (2017.01)  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
A61P 11/00

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2013 05197**  
(22) Дата подання заявки: **07.11.2011**  
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **11.09.2017**  
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/411,083**  
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **08.11.2010**  
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**  
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.10.2013, Бюл.№ 19**  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **11.09.2017, Бюл.№ 17**  
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/EP2011/069571, 07.11.2011**  
(72) Винахідник(и):  
**Бредлі Мішель (GB),  
Браун Зарін (GB),  
Чарлтон Стівен Джон (GB),  
Кромі Карен (GB/BE),  
Домбрехт Бруно (BE),  
Стеффенсен Сорен (DK/BE),  
ван Хеке Джино (BE/GB)**  
(73) Власник(и):  
**НОВАРТИС АГ,  
Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Switzerland (CH)**  
(74) Представник:  
**Ошарова Ірина Олександрівна, реєстр. №9**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
US 5440021 A, 08.08.1995  
WO 01/72830 A2, 04.10.2001  
MUYLDERMANS S: "SINGLE DOMAIN CAMEL ANTIBODIES: CURRENT STATUS", REVIEWS IN MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 74, no. 4, 1 June 2001 (2001-06-01), pages 277-302, XP001057480  
HOLLIGER PHILIPP ET AL: "ENGINEERED ANTIBODY FRAGMENTS AND THE RISE OF SINGLE DOMAINS", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 23, no. 9, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 1126-1136, XP008076746  
WO 2004/081026 A2, 23.09.2004  
WO 2010/043650 A2, 22.04.2010  
GABELLINI C ET AL: "Functional activity of CXCL8 receptors, CXCR1 and CXCR2, on human malignant melanoma progression", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 45, no. 14, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 2618-2627, XP026641847  
RAIMONDO M ET AL: "S2008 CXC-Chemokine/CXCR2 Biological Axis Promotes Angiogenesis In Vitro and In Vivo in Pancreatic Cancer", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, vol. 136, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages A-312, XP026111971  
BARNES PETER J: "New therapies for chronic obstructive pulmonary disease.", MEDICAL PRINCIPLES AND PRACTICE : INTERNATIONAL JOURNAL OF THE KUWAIT UNIVERSITY, HEALTH SCIENCE CENTRE 2010 LNKD- PUBMED:20639653, vol. 19, no. 5, 14 June 2010 (2010-06-14), pages 330-338, XP002673462  
TRAVERES SUZANNE L ET AL: "Specific CXC but not CC chemokines cause elevated monocyte migration in COPD: a role for CXCR2.", JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY AUG 2004 LNKD- PUBMED:15155777, vol. 76, no. 2, August 2004 (2004-08), pages 441-450, XP009157874

UA 115027 C2

**(54) CXCR2-ЗВ'ЯЗУЮЧІ ПОЛІПЕПТИДИ**

---

**(57) Реферат:**

Винахід стосується поліпептиду, який містить щонайменше два антигензв'язуючих домени імуноглобуліну, де поліпептид спрямований проти хемокінового рецептора CXCR2 або зв'язується з цим рецептором. Винахід також стосується нуклеїнової кислоти, вектору експресії та клітини-хазяїна, здатної експресувати поліпептид за винаходом, а також фармацевтичної композиції, що містить зазначений поліпептид.

Даний винахід відноситься до поліпептидів, які спрямовані проти хемокинового рецептору CXCR2 або які специфічно зв'язуються із цим рецептором, зокрема, до поліпептидів, здатних модулювати передачу сигналу від CXCR2. Даний винахід також відноситься до нуклеїнових кислот, до векторів та до клітин-хазяїв, здатних експресувати поліпептиди відповідно до винаходу, до фармацевтичних композицій, що містять поліпептиди, та до застосування зазначених поліпептидів і композицій для лікування хронічної обструктивної хвороби легенів (ХОХЛ) та інших захворювань, пов'язаних з порушенням функції CXCR2.

Попередній рівень техніки

Термін "хронічна обструктивна хвороба легенів (ХОХЛ)" використовується для опису ряду розладів, що характеризуються порушенням прохідності дихальних шляхів, яке, у більшості випадків, є прогресуючим та пов'язане з аномальною запальною відповіддю легенів на токсичні частки, що приводить до деструкції паренхіми легенів та до зниження функції дихальних шляхів (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). Хоча за розвиток ХОХЛ відповідальні генетичні фактори та фактори навколишнього середовища, однак, найголовнішою причиною розвитку такого захворювання є паління з рецидивуючою інфекцією легенів, що приводить до прогресуючого погіршення функції легенів. Припинення паління сповільнює прогресування захворювання лише на ранній стадії, а після появи явних симптомів дає незначний ефект. З ХОХЛ зв'язано кілька супутніх патологічних станів, таких як астма, серцево-судинне захворювання, депресія та м'язове виснаження (Mannino DM and Buist S, 2007 Global burden of COPD: risk factors, prevalence and future trends. Lancet, 370, 765-773).

Серед хемотаксичних факторів переважають хемокіни, а тому вони відіграють ключову роль у розвитку хронічного запалення легенів при ХОХЛ та у його наступних різких загостреннях. Біологічна активність хемокинів IL-8 (CXCL8), GRO $\alpha$  (CXCL1) та ENA-78 (CXCL5) опосередковується двома популяціями рецепторів CXCR1 та CXCR2 клітинної поверхні, які присутні на лейкоцитах та на клітинах багатьох інших типів у організмі. Міграція лейкоцитів опосередковується, головним чином, рецептором CXCR2, який зв'язується з декількома лігандами, включаючи IL-8, GRO $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , ENA-78 та GCP-2. На противагу цьому, CXCR1 селективно активується IL-8 та меншою мірою GCP-2. При цьому, залишається неясним, чи може хемотаксис нейтрофілів людини *in vivo* опосередковуватися одним або обома рецепторами.

Амінокислотна послідовність CXCR2 на 78% гомологічна амінокислотній послідовності CXCR1, та обидва ці рецептори присутні на нейтрофілах з різними профілями розподілу. Експресія CXCR2 на різних клітинах і тканинах, включаючи CD8<sup>+</sup>-Т-клітини, NK, моноцити, гладкі клітини, епітеліальні клітини, ендотеліальні клітини, клітини гладких м'язів та клітини-хазяї центральної нервової системи, дозволяє припустити, що цей рецептор може відіграти головну функціональну роль як у симптоматичних станах, так і у патофізіології ряду гострих та хронічних захворювань. Активізація CXCR2 стимулює зв'язування рецептору з Gi-сімейством білків, що зв'язуються з гуаніновими нуклеотидами, що, у свою чергу, приводить до стимуляції вивільнення внутрішньоклітинних фосфатів інозиту, до підвищення рівня внутрішньоклітинного Ca<sup>2+</sup> та, під дією ERK1/2-залежних механізмів, до фосфорилування внутрішньоклітинних білків, пов'язаних із прямою міграцією клітин відповідно до градієнта хемокинів. Після активації, CXCR2 фосфорилується та швидко інтерналізується під дією аррестин/динамін-залежних механізмів, що приводить до десенсибілізації рецепторів. Цей процес аналогічний процесу, спостережуваному для більшості інших GPCR, але швидкість та ступінь індукованої агоністом інтерналізації CXCR2 вище, ніж швидкість та ступінь інтерналізації, спостережуваної для CXCR1 (Richardson R., Pridgen B.C., Haribabu B, Ali H., Synderman R. 1998 Differential cross-regulation of the human chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. Evidence for time-dependent signal generation. J. Biol. Chem, 273, 23830-23836).

Довгий час вважалося, що IL-8 є нейтрофільним медіатором запалення при ХОХЛ (Keatings V.M. et al., 1996, Differences in IL-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in induced sputum from patients with COPD and asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153, 530-534; Yamamoto C et al. 1997 Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. Chest, 112, 505-510). При біопсії бронхіальних шляхів, малих дихальних шляхів і паренхіми легенів у пацієнтів з ХОХЛ, спостерігається інфільтрація Т-клітин та підвищене число нейтрофілів, особливо у просвітах дихальних шляхів (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 нейтрофілів збільшується у легких пацієнтів з ХОХЛ, що корелює зі ступенем важкості захворювання (Keatings V.M. et al., 1996, Differences in IL-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in induced sputum from patients with COPD and

asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153, 530-534). Крім того, у мокротинні пацієнтів з ХОХЛ підвищуються рівні  $TNF\alpha$ , що приводить до індукування вивільнення IL-8 з епітеліальних клітин дихальних шляхів (Keatings). Концентрація  $GRO\alpha$  помітно збільшується у індукованому мокротинні та у бронхоальвеолярному лаважі (БАЛ), взятому у пацієнтів з ХОХЛ, на відміну від концентрації  $GRO\alpha$  у звичайних курців та у людей, що не палять (Traves SL et al 2002, Increased levels of the chemokines  $GRO\alpha$  and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax*, 57, 50-595; Pesci A. et al. 1998, Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with COPD. *Eur. Respir J.* 12, 380-386).  $GRO\alpha$  секретується альвеолярними макрофагами та епітеліальними клітинами дихальних шляхів у відповідь на  $TNF\alpha$ -стимуляцію та селективно активує CXCR2, який має хемотаксичну дію на нейтрофіли та моноцити. У пацієнтів з ХОХЛ спостерігається посилення моноцитарної хемотаксичної відповіді на  $GRO\alpha$ , яке може бути пов'язане з підвищенням метаболізму або рециклінгу CXCR2 у цих клітинах (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). Вірусна та бактеріальна інфекція легенів часто приводить до серйозного загострення захворювання у пацієнтів з ХОХЛ, яке характеризується підвищенням числа нейтрофілів у дихальних шляхах (Wedzicha JA, Seemungal TA., 2007, COPD exacerbations: defining their cause and prevention, *Lancet* 370 (9589): 786-96). Бронхіальна біопсія пацієнтів з гострим важким загостренням ХОХЛ виявила значне збільшення рівня експресії мРНК ENA-78, IL-8 і 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), та підвищену кількість нейтрофілів у мокротинні (Bathoorn E, Liesker J.Jw., Postma DS et al., Change in inflammation in out-patient COPD patients from stable phase to a subsequent exacerbation, (2009) *Int. J. COPD*, 4(1): 101-9), що дозволяє припустити потенційну роль рецептору CXCR2 у розвитку ХОХЛ та у різкому загостренні цього захворювання. У біоптатах бронхів спостерігається підвищений рівень експресії мРНК CXCR2, та цей рівень експресії корелює із присутністю нейтрофілів у тканинах (Qiu 2003). ENA-78 вивільняється, головним чином, з епітеліальних клітин, при цьому, значне підвищення рівня експресії ENA-78 у епітеліальних клітинах спостерігається при загостренні ХОХЛ (Qiu 2003). Оскільки в дихальних шляхах при ХОХЛ спостерігаються підвищені концентрації IL-8,  $GRO\alpha$  і ENA-78, та всі три ліганди передають сигнал за допомогою CXCR2, тоді блокування цього загального рецептору селективними антагоністами може слугувати ефективною протизапальною стратегією при лікуванні зазначеного захворювання.

ХОХЛ розвивається повільно та поступово прогресує, та прогресування цього захворювання традиційно оцінюють за допомогою тестів на функцію легенів, тобто, спірометричного вимірювання форсованого обсягу видиху в одну секунду (FEV1). Пацієнти з прогнозованим  $FEV1 < 50\%$  класифікуються як пацієнти з важким захворюванням. Функція легенів чітко корелює з коефіцієнтом смертності, тобто, протягом 12 років вмирає приблизно 35% пацієнтів з важкою формою ХОХЛ, та лише 5% пацієнтів з легкою або помірною формою цього захворювання. По смертності в усьому світі, ХОХЛ посідає четверте місце (за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (BOO3) World Health Report, Geneva, 2000. Ці дані доступні на сайті URL: [http://www.who.int/whr/2000/en/whr00\\_annex\\_en.pdf](http://www.who.int/whr/2000/en/whr00_annex_en.pdf)) та в найближче десятиліття захворюваність та смертність від цієї хвороби, швидше за все, буде підвищуватися (Lopez AD, Shibuya K, Rao S et al., 2006, Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections, *Eur Respir J.*, 27(2), 397-412). Загострення цього захворювання є ключовими чинниками та виражаються у поступовому погіршенні стану здоров'я пацієнта, що протікає по спіралі, та ці загострення у високому ступені відповідальні за переважну більшість випадків госпіталізації хворих з ХОХЛ (BTS (British Thoracic Society), 2006, Burden of Lung Disease Report, 2<sup>nd</sup> ed, [http://www.brit-thoracic.org.Uk/Portals/0/Library/BTS%20Publications/burden\\_of\\_lung\\_disease2007.pdf](http://www.brit-thoracic.org.Uk/Portals/0/Library/BTS%20Publications/burden_of_lung_disease2007.pdf)). Середні щорічні коефіцієнти для симптоматичних та діагностованих загострень становлять 2,3 та 2,8 (O'reilly JF, Williams AE, Holt K et al, 2006, *Prim Care Respir J.* 15(6): 346-53). Діагностика на ранній стадії захворювання та призначення підходящого лікування пацієнтові із загостренням, а також відповідні профілактичні заходи допоможуть знизити навантаження на вже перевантажені клініки. Застосовувані в цей час способи лікування ХОХЛ є, головним чином, паліативними, та в цей час не існує яких-небудь способів лікування, які могли б призупинити погіршення функції легенів або прогресуючу деструкцію дихальних шляхів, пов'язану із цим захворюванням. Для ослаблення симптомів та лікування загострення захворювання застосовуються сучасні методи терапії, такі як введення  $\beta$ -адренергічних бронхолітичних засобів короточасної та пролонгованої дії, введення антихолінергічних засобів шляхом інгаляції (мускаринових антагоністів) та введення кортикостероїдів шляхом інгаляції. Істотним недоліком сучасної терапії із застосуванням кортикостероїдів є те, що згодом кортикостероїди стають



неефективними, оскільки у пацієнтів виробляється резистентність до цих кортикостероїдів, що приводить до інактивації протизапальної дії цих лікарських засобів. Зовсім очевидно, що існує величезна та поки ще незадоволена потреба у нових лікарських засобах, що дозволяють запобігати прогресуванню ХОХЛ. Антагоністи хемокінових рецепторів є привабливим засобом для терапії ХОХЛ, оскільки транспорт запальних клітин при ХОХЛ управляється безліччю хемокінів, а тому блокада хемокінових рецепторів низькомолекулярними антагоністами може служити ефективною протизапальною стратегією при лікуванні такого захворювання. Головною відмінною ознакою ХОХЛ є посилення запальної відповіді, спостережуване у звичайних курців, а тому терапія ХОХЛ ставить своєю метою не повне пригнічення інфільтрації запальних клітин, а лише зниження їх числа до рівнів, спостережуваних у здорових курців без ХОХЛ. Антагоністи CXCR2, завдяки їхній специфічній дії, діють не по загальному механізму імуносупресії, пов'язаному з дією стероїдів, а по механізму збереження CXCR1, який дозволяє активувати базальні нейтрофіли, що є важливим чинником для захисту хазяїна від ХОХЛ та від СН (серцевої недостатності). У цей час, більшість лікарських засобів проти ХОХЛ вводять шляхом інгаляції для зниження системних побічних ефектів, однак, оскільки антагоністи хемокінів діють на рецептори, що експресуються в запальних клітинах кровотоку, таке системне введення повинне бути оптимальним. Таким чином, необхідно розробити ефективний лікарський засіб, який здатний досягати малих дихальних шляхів та паренхіми легенів, уражених ХОХЛ.

Хемокінові рецептори, на противагу цитокиновим та інтерлейкіновим рецепторам, належать до суперсімейства рецепторів 7TM-GPCR, що дають сильний "лікарський" ефект. Незважаючи на це, початі раніше спроби виявити сильні антагоністи зіштовхнулися із ще більшими труднощами, ніж це очікувалося, виходячи з експериментів з рецепторами GPCR, що мають невеликі пептидні або біогенні амінові ліганди. Спроби розробити програми виявлення невеликих молекул лікарських засобів, спрямовані на виявлення антагоністів хемокінових рецепторів, дозволяють поступово зрозуміти ідіосинкразію хемокінових рецепторів та структурних елементів, необхідних для функціонування невеликих молекул як антагоністів. Цікаво відзначити, що структурна різноманітність антагоністів CC-хемокінових рецепторів, представлених рядом фундаментально одмінних серій ідентифікованих хімічних сполук, значно перевищує структурну різноманітність антагоністів CXCR-хемокінових рецепторів, що дає підставу припустити, що відносні труднощі у виявленні антагоністів можуть полягати у відмінності між двома класами рецепторів.

Загалом було підтверджено, що хемокінові рецептори є важкодоступними мішенями для їхнього пригнічення, та були зроблені величезні зусилля для ідентифікації сильних селективних антагоністів CXCR2. Низькомолекулярний антагоніст CXCR2 був вперше описаний у 1998 році, оскільки був розроблений ряд не-конкурентних алостеричних антагоністів CXCR2, деякі з яких у цей час перебувають у стадії клінічних випробувань. Проте, зовсім очевидно необхідно розробити більш ефективні та сильні антагоністи функції CXCR2.

Молекули, що належать до класу імуноглобулінів, знаходять усе більш широке застосування у медицині за останні десять років або більше. Специфічність цих молекул до мішені та можливість їх конструювання із застосуванням рекомбінантних методів обіцяє величезні перспективи з погляду розробки у високому ступені спрямованого лікування захворювання. Молекули імуноглобулінів багатьох типів та модифіковані молекули імуноглобулінів, включаючи стандартні чотириланцюгові антитіла, Fab- та F(ab)2-фрагменти, однодоменні антитіла (D(ab)), одноланцюгові Fv та нанотіла, є потенційно доступними для їхнього відповідного конструювання. Ці молекули будуть більш докладно обговорюватися нижче у розділах даного опису, що відносяться до поліпептидів, сконструйованих таким чином, щоб вони були безпосередньо спрямовані щонайменше на два епітопи CXCR2.

Тому, метою даного винаходу є розробка нових засобів для профілактики або лікування хронічної обструктивної хвороби легенів, або ХОХЛ та інших захворювань, пов'язаних з порушенням функцій хемокінового рецептору CXCR2.

Іншою метою даного винаходу є розробка способу лікування або профілактики ХОХЛ та інших захворювань, пов'язаних з порушенням функцій CXCR2, де зазначеним способом є імунотерапія.

Ще однією метою даного винаходу є одержання поліпептиду, що містить CDR імуноглобуліну, та що представляє собою антагоніст передачі сигналу CXCR2.

Опис сутності винаходу

Даний винахід відноситься до поліпептиду, що містить щонайменше два антигензв'язуючих домени імуноглобуліну, де поліпептид спрямований проти хемокінового рецептору CXCR2 або зв'язується із цим рецептором, та де зазначений поліпептид включає перший антиген зв'язуючий домен, що розпізнає перший епітоп на CXCR2, та другий антигензв'язуючий домен,

що розпізнає другий епітоп на CXCR2. Кращий поліпептид відповідно до винаходу містить перший антигензв'язуючий домен, здатний зв'язуватися з лінійним пептидом, що складається із амінокислотної послідовності SEQ ID NO:7, та другий антигензв'язуючий домен, який або не здатний зв'язуватися із зазначеним лінійним пептидом, або зв'язується із цим пептидом з меншої афінністю. SEQ ID NO:7 являє собою перші 19 N-кінцевих амінокислот CXCR2 людини. Кращий поліпептид відповідно до винаходу є біпаратопним. Використовуваний у даному документі термін "біпаратопний" означає, що даний поліпептид містить два антигензв'язуючих домени, що розпізнають два різні епітопи на тому самому білку-мішені. Однак, поліпептиди, які є мультипаратопними, тобто, містять антигензв'язуючі домени, що розпізнають три, чотири або більш епітопів на тому самому білку-мішені, також входять у обсяг даного винаходу, оскільки вони являють собою поліпептиди, які є бі- або мультипаратопними та полівалентними, тобто, містять антигензв'язуючі домени, що розпізнають один або декілька інших білків-мішеней.

У кращих варіантах здійснення поліпептидів по винаходу, амінокислотна послідовність, що містить перший антигензв'язуючий домен, та амінокислотна послідовність, що містить другий антигензв'язуючий домен, зв'язані одна з іншою лінкерною областю. Як більш докладно обговорюється нижче, лінкер може походити, а може й не походити від імуноглобуліну, але, переважно, він є пептидом.

В особливо кращих поліпептидах відповідно до винаходу, зазначений перший антигензв'язуючий домен міститься у одному варіабельному домені першого імуноглобуліну, а зазначений другий антигензв'язуючий домен міститься у одному варіабельному домену другого імуноглобуліну. Щонайменше один із зазначених окремих варіабельних доменів першого та другого імуноглобуліну може являти собою  $V_L$ -домен або його фрагмент, або він може являти собою  $V_H$ -домен або його фрагмент. Поліпептиди, де кожний перший та другий антигензв'язуючі домени містяться у  $V_L$ -доменах або їх фрагментах, або де кожний перший та другий антигензв'язуючі домени містяться у  $V_H$ -доменах або їх фрагментах, входять у обсяг даного винаходу. Поліпептид відповідно до винаходу може містити амінокислотні послідовності обох  $V_L$  та  $V_H$  або їх фрагменти у одній молекулі.

У інших кращих варіантах здійснення винаходу, перший та другий антигензв'язуючі домени містяться у одному з варіабельних доменів першого та другого імуноглобуліну, які являють собою доменні антитіла (dAb). У найбільш кращих варіантах здійснення винаходу, щонайменше один, переважно, обидва зазначені перший та другий антигензв'язуючі домени містяться у одному з варіабельних доменів імуноглобуліну, які являють собою  $V_{HH}$ -домен або його фрагмент, що походить від одного важкого ланцюгу антитіла з важким ланцюгом, отриманого від тваринного сімейства верблюжих, або його гуманізований варіант, у який була введена щонайменше одна заміна людського амінокислотного залишку у каркасній області.

Один варіабельний домен імуноглобуліну, який має амінокислотну послідовність  $V_{HH}$ , або його фрагмент або варіант, що походить тільки від антитіла з важким ланцюгом, отриманого від тваринного сімейства верблюжих, може альтернативно, називатися у даному документі " $V_{HH}$ -доменом" або його фрагментом, або "нанотілом". Слід зазначити, що Nanobody®, Nanobodies® та Nanoclone® (нанотіло, нанотіла та наноклон) зареєстровані під торговельними знаками Ablynx N.V.

У поліпептидах відповідно до винаходу, кожний антигензв'язуючий домен містить щонайменше одну визначену у даному документі CDR, переважно, дві або три CDR. У кращих поліпептидах відповідно до винаходу, кращою структурою одного з варіабельних доменів імуноглобуліну є  $V_{HH}$ -домен або нанотіло, а саме, структура:

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

де CDR та FR додатково визначені нижче.

Кращі біпаратопні нанотіла відповідно до винаходу мають одну з нижченаведених структур:

i) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-лінкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8

ii) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-лінкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8-лінкер-HLE

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

де: якщо FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 містить перший антигензв'язуючий домен (що зв'язується з лінійною SEQ ID NO:7), те FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 містить другий антигензв'язуючий домен (що не зв'язується з лінійною SEQ ID NO:7), а якщо FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 містить другий антигензв'язуючий домен (що не зв'язується з лінійною SEQ ID NO:7), те FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 містить перший антигензв'язуючий домен (що зв'язується з лінійною SEQ ID NO:7), а HLE являє собою зв'язуючу ланку, що сприяє збільшенню часу напівжиття *in vivo*.

Фрагменти або варіанти кращого біпаратопного нанотіла, описаного вище, входять у обсяг даного винаходу, включаючи варіанти здійснення, у яких CDR та FR походять від тваринного сімейства верблужих, або варіанти, у яких одна або декілька FR мають щонайменше одну заміну людським залишком, переважно, є повністю гуманізованими.

Особливо кращими біпаратопними нанотілами відповідно до винаходу є антитіла, позначені у даному документі 163D2/127D1, 163E3/127D1, 163E3/54B12, 163D2/54B12, 2B2/163E3, 2B2/163D2, 97A9/2B2 та 97A9/54B12, та що мають амінокислотні послідовності, представлені у таблиці 13, зокрема, їх варіанти, у яких FR включають послідовність із оптимізованими амінокислотними замінами, визначеними нижче та представленими у описі компонентів нанотілу у таблиці 32.

Особливо кращі додаткові біпаратопні нанотіла відповідно до винаходу представлено у таблиці 33.

Поліпептиди відповідно до винаходу являють собою модулятори передачі сигналу CXCR2, які блокують, знижують або інгібують активність CXCR2. Вони можуть інгібувати зв'язування природного ліганду, наприклад, GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з  $IC_{50}$  менше, ніж 20 nM. Переважно, поліпептиди відповідно до винаходу, зокрема, біпаратопні нанотіла відповідно до винаходу мають здатність перехресно блокувати зв'язування CXCR2 з одним або декількома з 163D2/127D1, 163E3/127D1, 163E3/54B12, 163D2/54B12, 2B2/163E3, 2B2/163D2, 97A9/2B2 та 97A9/54B12, обговорюваними вище.

Описаний у даному документі винахід також охоплює структурні блоки одновалентних поліпептидів, які використовуються при конструюванні бі- або мультипаратопних, або полівалентних нанотілу. Кращими одновалентними нанотілами є кожний та всі поліпептиди з амінокислотними послідовностями, представленими у таблиці 9, у таблиці 34, або з амінокислотними послідовностями, у яких щонайменше одна з каркасних областей має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотній послідовності, представлений у таблиці 9 або у таблиці 34. Кращими одновалентними нанотілами є нанотіла, представлені у таблиці 9 та, де щонайменше одна послідовність має оптимізуючу амінокислотну заміну у каркасній області, такий як каркасна область нанотілу, представлених у таблиці 32 або у таблиці 34. Особливо кращим є одновалентне нанотіло, позначене 137B7, та його оптимізована послідовність, та їх варіанти.

Кращі поліпептиди відповідно до винаходу зв'язуються з епітопом, що складається із амінокислот F11, F14 та W15 SEQ ID NO:1 (CXCR2). У кращих біпаратопних поліпептидах відповідно до винаходу, таких як біпаратопні нанотіла, другий антигензв'язуючий домен зв'язується з епітопом, розташованим у зовнішніх петлях CXCR2 людини (амінокислотні залишки 106-120, 184-208 та 274-294 SEQ ID NO:1). У одному з варіантів винаходу, зазначений епітоп є конформаційним. У одному з варіантів винаходу, зазначений епітоп містить амінокислотні залишки W112, G115, I282 і T285 SEQ ID NO:1.

Даний винахід також включає молекули нуклеїнової кислоти, що кодують будь-який поліпептид відповідно до винаходу, а також нуклеїнові кислоти, що кодують їхні фрагменти, такі як нуклеїнові кислоти, що кодують окремі нанотіла, які містяться в біпаратопних нанотілах. Вектори, що містять нуклеїнові кислоти відповідно до винаходу, та клітини-хазяї, що містять зазначені вектори та здатні експресувати поліпептид відповідно до винаходу, також входять у обсяг даного винаходу.

У іншому аспекті, даний винахід відноситься до фармацевтичних композицій, що містять поліпептид відповідно до винаходу у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм, розріджувачем або наповнювачем. Оскільки поліпептиди відповідно до винаходу здатні блокувати, інгібувати або знижувати активність CXCR2, тоді вони можуть бути використані для лікування захворювань, у розвитку яких певну роль відіграє порушення передачі сигналу від CXCR2. Такими захворюваннями можуть бути атеросклероз, гломерулонефрит, запальне захворювання кишечника (хвороба Крона), ангиогенез, розсіяний склероз, псоріаз, вікова дегенерація жовтої плями, очна хвороба Бехчета, увеїт, недрібноклітинна карцинома, рак товстої кишки, рак підшлункової залози, рак стравоходу, меланома, гепатоцелюлярна карцинома або ішемічне реперфузійне ушкодження. Такими захворюваннями можуть бути також розлади дихальних шляхів, такі як кистозний фіброз, астма у важкій формі, загострення астми, алергічна астма, гостре ураження легенів, гострий респіраторний дистрес-синдром, ідіопатичний фіброз легенів, ремоделювання дихальних шляхів, синдром облітеруючого бронхіоліту або бронхопальмонарна дисплазія.

У особливо кращому варіанті здійснення винаходу поліпептиди відповідно до винаходу застосовуються для лікування хронічної обструктивної хвороби легенів (ХОХЛ) або загострення ХОХЛ, які характеризуються міграцією лейкоцитів, зокрема, нейтрофілів, у паренхіму легенів з її

наступною деструкцією, де міграція опосередковується передачею CXCR2-сигналу. Завдяки здатності поліпептидів відповідно до винаходу блокувати, інгібувати або знижувати активність CXCR2, ці поліпептиди є найкращими кандидатами на їхнє застосування для профілактики або лікування зазначеного захворювання.

Для лікування людини, переважно, щоб поліпептид відповідно до винаходу був спрямований безпосередньо проти CXCR2 людини або специфічно зв'язувався з ним. Однак, більш переважно, щоб зазначений поліпептид міг перехресно реагувати з CXCR2 приматів, зокрема, з CXCR2 собакоподібних мавп, для того, щоб відповідний тест на токсичність можна було проводити на зазначених мавпах. Поліпептиди відповідно до винаходу, у тому випадку, якщо вони застосовуються у ветеринарії, можуть бути спрямовані безпосередньо проти гомологів CXCR2 або можуть специфічно зв'язуватися із зазначеними гомологами, що походять від тварин інших видів.

Інші аспекти винаходу будуть очевидні з нижченаведеного обговорення.

Визначення

Далі приводяться опис винаходу, приклади та формула винаходу:

а) Якщо це не зазначено або не застережено особливо, тоді всі використовувані у даному документі терміни мають свої загальноприйняті значення, відомі фахівцям. Наприклад, опис цих термінів можна знайти в стандартних настановах, згаданих нижче. Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd. Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel et al, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, New York, N.Y., (1985); Old et al., "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", 2nd edition, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt et al., "Immunology" (6th. Ed.), Mosby/Elsevier, Edinburgh (2001); Roitt et al., Roitt's Essential Immunology, 10 Ed. Blackwell Publishing, UK (2001); and Janeway et al., "Immunobiology" (6th Ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York (2005).

б) Якщо це не застережено особливо, тоді термін "імуноглобулін" або "послідовність імуноглобуліну", незалежно від того, чи відноситься він до антитіла з важким ланцюгом або до стандартного 4-ланцюгового антитіла, використовується у даному документі як загальний термін, що включає повнорозмірне антитіло, його окремі ланцюги, а також усі його частини, домени або фрагменти (включаючи, але не обмежуючись ними, антигензв'язуючі домени або їх фрагменти, такі як  $V_{HH}$ -домени або  $V_H/V_L$ -домени, відповідно). Крім того, використовуваний у даному документі термін "послідовність" (наприклад, у таких словосполученнях, як "послідовність імуноглобуліну", "послідовність антитіла", "послідовність варіабельного домену", "послідовність  $V_{HH}$ " або "послідовність білку"), загалом, включає відповідну амінокислотну послідовність, а також послідовності нуклеїнової кислоти або нуклеотидні послідовності, що кодують зазначену амінокислотну послідовність, якщо у контексті даного опису не мається на увазі більш обмежена інтерпретація.

с) Якщо це не застережено особливо, тоді термін "один варіабельний домен імуноглобуліну" використовується у даному документі як загальний термін, що включає, але не обмежуваний ними, антигензв'язуючі домени або фрагменти, такі як  $V_{HH}$ -домени, або  $V_H$ - або  $V_L$ -домени, відповідно. Терміни "антигензв'язуючі молекули" або "антигензв'язуючі білки" є синонімами та також включають поняття "нанотіла". Один з варіабельних доменів імуноглобуліну також являє собою послідовність варіабельного домену легкого ланцюгу (наприклад,  $V_L$ -послідовність) або послідовність варіабельного домену важкого ланцюгу (наприклад,  $V_H$ -послідовність), більш конкретно, вони можуть являти собою послідовності варіабельного домену важкого ланцюгу, що походять від стандартного чотириланцюгового антитіла, або послідовності варіабельного домену важкого ланцюгу, що походять від антитіла з важким ланцюгом. Відповідно до цього, окремі варіабельні домени імуноглобуліну можуть являти собою доменні антитіла або послідовності імуноглобуліну, які можуть бути використані як доменні антитіла, тобто, односторонні антитіла або послідовності імуноглобуліну, які можуть бути використані як односторонні антитіла, тобто, "dAb", або послідовності імуноглобуліну, які можуть бути використані як dAb або нанотіл, включаючи, але не обмежуючись ними, послідовності  $V_{HH}$ . Даний винахід включає послідовності імуноглобуліну різного походження, включаючи послідовності імуноглобуліну, що походять від мишей, щурів, кроликів, ослів, людини та тварин сімейства верблужих. Один варіабельний домен імуноглобуліну включає повністю людську послідовність, гуманізовану послідовність, послідовність, оптимізовану яким-небудь іншим способом, або химерну послідовність імуноглобуліну. Один варіабельний домен імуноглобуліну та структура одного варіабельного домену імуноглобуліну можуть розглядатися, але не обмежуються ними, як варіабельний домен та його структура, що складається із чотирьох

каркасних областей "FR", які відомі фахівцям та згадуються у даному документі як "каркасна область 1" або "FR1"; "каркасна область 2" або "FR2"; "каркасна область 3" або "FR3"; та "каркасна область 4" або "FR4", відповідно, де зазначені каркасні області перериваються трьома гіперваріабельними областями (комплементарність-визначальними областями) або "CDR", які відомі фахівцям як "гіперваріабельна область 1" або "CDR1"; "гіперваріабельна область 2" або "CDR2" та "гіперваріабельна область 3" або "CDR3", відповідно.

d) Якщо це не застережене особливо, тоді всі методи, стадії, способи та модифікації, які докладно не описані у даній заявці, можуть бути здійснені та були здійснені способом, відомим per se, як очевидно для фахівця у даній галузі. У цьому зв'язку можна звернутися до згаданих у даному документі стандартних настанов та загальних довідкових матеріалів, а також до робіт, що цитуються у них, та, наприклад, до нижченаведених публікацій 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, у яких описані методи конструювання білків, наприклад, метод дозрівання афінності та інші методи підвищення специфічності та поліпшення інших потрібних властивостей білків, таких як імуноглобуліни.

e) Амінокислотні залишки позначені стандартним трибуквеним або однобуквеним кодом.

f) Для порівняння двох або більш нуклеотидних послідовностей, відсоток "ідентичності послідовностей", тобто, відсоток ідентичності між першою нуклеотидною послідовністю та другою нуклеотидною послідовністю може бути обчислений або визначений шляхом ділення [числа нуклеотидів у першій нуклеотидній послідовності, ідентичних нуклеотидам у відповідних положеннях у другій нуклеотидній послідовності] на [загальне число нуклеотидів у першій нуклеотидній послідовності] та множення на [100%], де кожна делеція, інсерція, заміна або додавання нуклеотиду у другій нуклеотидній послідовності, порівнюваній з першою нуклеотидною послідовністю, розглядається як відмінність у одному нуклеотиді (положенні); або такий відсоток може бути обчислений з використанням підходящого комп'ютерного алгоритму або методу. Ступінь ідентичності двох або більше нуклеотидних послідовностей може бути обчислена з використанням відомого комп'ютерного алгоритму для вирівнювання послідовностей, такого як NCBI Blast v2.0, з використанням стандартних параметрів. Деякі інші методи, комп'ютерні алгоритми та параметри для визначення ступеня ідентичності послідовностей описані, наприклад, у WO 04/037999, EP 0967284, EP 1085089, WO 00/55318, WO 00/78972, WO 98/49185 і GB 2357768-A. Звичайно, для визначення "відсотку ідентичності" двох нуклеотидних послідовностей відповідно до описаного вище методу обчислення, нуклеотидну послідовність із найбільшим числом нуклеотидів позначають як "першу" нуклеотидну послідовність, а іншу нуклеотидну послідовність позначають як "другу нуклеотидну послідовність".

g) Для порівняння двох або більше амінокислотних послідовностей, відсоток "ідентичності послідовностей" тобто, відсоток ідентичності між першою амінокислотною послідовністю та другою амінокислотною послідовністю (що також називається у даному документі "ідентичністю амінокислотних послідовностей") може бути обчислений або визначений шляхом ділення [числа амінокислотних залишків у першій амінокислотній послідовності, ідентичних амінокислотним залишкам у відповідних положеннях у другій амінокислотній послідовності] на [загальне число амінокислотних залишків у першій амінокислотній послідовності] та множення на [100%], де кожна делеція, інсерція, заміна або додавання амінокислотного залишку у другій амінокислотній послідовності, порівнюваній з першою амінокислотною послідовністю, розглядаються як відмінність у одному амінокислотному залишку (положенні), тобто, як "відмінність амінокислот", обумовлена у даній заявці; або такий відсоток може бути обчислений з використанням підходящого комп'ютерного алгоритму або методу. Для визначення відсотку "ідентичності" двох амінокислотних послідовностей відповідно до описаного вище методу обчислення, амінокислотну послідовність із найбільшим числом амінокислотних залишків позначають як "першу" амінокислотну послідовність, а іншу амінокислотну послідовність позначають як "другу" амінокислотну послідовність.

Крім того, для визначення ступеню ідентичності двох амінокислотних послідовностей, фахівцеві у даній галузі слід прийняти до уваги так звані "консервативні" амінокислотні заміни, описані нижче у пункті v).

Усі амінокислотні заміни можуть бути також введені у описані у даному документі поліпептиди виходячи з аналізу частоти амінокислотних відмінностей між гомологічними білками, що походять від різних видів, де зазначений аналіз був розроблений Schulz et al., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1978, виходячи з аналізу структуроутворюючих потенціалів, розробленого Chou & Fasman, Biochemistry 13: 211, 1974 and Adv. Enzymol., 47: 45-

149, 1978, та аналізу профілів гідрофобності білків, розробленого Eisenberg et al., Proc. Nad. Acad. Sci. USA 81: 140-144, 1984; Kyte & Doolittle; J. Molec. Biol. 157: 105-132, 1981, і Goldman et al., Ann. Rev. Biophys. Chem. 15: 321-353, 1986; усі зазначені публікації у всій своїй повноті вводяться у даний опис як посилання. Що стосується первинної та вторинної структури нанотіл, то кристалічна структура  $V_{HH}$ -домену лами описана, наприклад, у публікаціях Desmyter et al., Nature Structural Biology, Vol. 3, 9, 803 (1996); Spinelli et al., Natural Structural Biology (1996); 3, 752-757; і Decanniere et al., Structure, Vol. 7, 4, 361 (1999).

h) Термін "відмінність амінокислот", якщо він використовується при порівнянні двох амінокислотних послідовностей, означає інсерцію, делецію або заміну одного амінокислотного залишку у положенні першої послідовності, порівнюваної із другою послідовністю, та в цьому випадку мається на увазі, що дві амінокислотні послідовності можуть мати відмінності у одній, двох або більше зазначених амінокислот.

i) Якщо говорять, що нуклеотидна послідовність або амінокислотна послідовність "містить" іншу нуклеотидну послідовність або амінокислотну послідовність, відповідно, або "по суті, складається" з іншої нуклеотидної послідовності або амінокислотної послідовності, тоді це може означати, що остання нуклеотидна послідовність або амінокислотна послідовність включена у першу згадану нуклеотидну послідовність або амінокислотну послідовність, відповідно, але звичайно, це означає, що перша згадана нуклеотидна послідовність або амінокислотна послідовність містить фрагмент із нуклеотидів або амінокислотних залишків, відповідно, який має ту ж саму нуклеотидну послідовність або амінокислотну послідовність, відповідно, як і остання послідовність, незалежно від способу одержання або одержання першої згаданої послідовності (де зазначеним способом може бути, наприклад, будь-який підходящий описаний у даному документі спосіб). Як необмежуючий приклад можна сказати, що якщо один варіабельний домен біпаратопного імуноглобуліну, наприклад, нанотіла відповідно до винаходу містить послідовність CDR, тоді це може означати, що зазначена послідовність CDR включена в біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу, але звичайно, це означає, що біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить фрагмент із амінокислотних залишків, який має таку ж амінокислотну послідовність, що і зазначена послідовність CDR, незалежно від способу продукування або одержання зазначеного біпаратопного нанотіла. Слід також зазначити, що якщо остання амінокислотна послідовність має конкретну біологічну або структурну функцію, тоді переважно, щоб ця функція була, по суті, ідентична, аналогічна або еквівалентна біологічній або структурній функції першої згаданої амінокислотної послідовності (інакше кажучи, переважно, щоб перша згадана амінокислотна послідовність, так само як і остання послідовність, мала здатність здійснювати, в основному, ту ж саму, аналогічну або еквівалентну біологічну або структурну функцію). Так, наприклад, якщо говорять, що біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить послідовність CDR або каркасну послідовність, відповідно, тоді це означає, що CDR-послідовність та каркасна послідовність, що містяться у зазначеному біпаратопному наноантитілі, переважно, здатна функціонувати так само, як і послідовність CDR або каркасна послідовність, відповідно. Крім того, якщо говорять, що нуклеотидна послідовність містить іншу нуклеотидну послідовність, тоді це означає, що перша зі згаданих нуклеотидних послідовностей є, переважно, такою, що, якщо вона експресується з утворенням продукту експресії (наприклад, поліпептиду), тоді амінокислотна послідовність, що кодується останньою нуклеотидною послідовністю, утворює частину зазначеного продукту експресії (інакше кажучи, це означає, що остання нуклеотидна послідовність знаходиться в одній рамці зчитування з першою згаданою більшою нуклеотидною послідовністю).

j) Вважається, що послідовність нуклеїнової кислоти або амінокислотна послідовність присутня "в основному, у виділеній формі", наприклад, у порівнянні з її нативним біологічним джерелом та/або реакційним середовищем, або культуральним середовищем, з якого вона була виділена, якщо вона була виділена щонайменше з одного іншого компоненту, з яким ця послідовність звичайно зв'язана у зазначеному джерелі або у середовищі, такими як інша нуклеїнова кислота, інший білок/поліпептид, інший біологічний компонент або макромолекула або щонайменше одна контамінуюча речовина, домішка або невеликий компонент. Зокрема, послідовність нуклеїнової кислоти або амінокислотна послідовність вважається "в основному виділеною", якщо ступінь її чистоти вище щонайменше у 2 рази, зокрема, щонайменше у 10 разів, більш конкретно, щонайменше у 100 разів та до 1000 разів або більше. Послідовність нуклеїнової кислоти або амінокислотна послідовність, яка присутня "в основному у виділеній формі", переважно, є по суті гомогенною, як було визначено із застосуванням підходящого методу, такого як підходящий хроматографічний метод, наприклад, електрофорез у поліакриламідному гелі.

k) Використовуваний у даному документі термін "антигензв'язуючий домен" означає

амінокислотну послідовність імуноглобуліну, що містить щонайменше одну CDR, та що має конформацію, яка розпізнає мішень, а саме, антигенну детермінанту або епітоп.

l) Використовувані у даному документі терміни "антигенна детермінанта" та "епітоп", які можуть бути синонімами, означають амінокислотну послідовність у CXCR 2-мішені, яка розпізнається антигензв'язуючими доменами, незалежно від того, чи має така амінокислотна послідовність лінійну або нелінійну конформацію.

m) Поліпептид відповідно до винаходу, такий як, наприклад, описане у даному документі біпаратопне нанотіло або його фрагмент, які можуть (специфічно) зв'язуватися, афінно зв'язуватися та/або специфічно зв'язуватися зі специфічною антигенною детермінантою, специфічним епітопом, антигеном або білком (або щонайменше з однією його частиною, фрагментом або епітопом), розглядається як поліпептид, спрямований "проти" або спрямований "безпосередньо проти" зазначеної антигенної детермінанти, зазначеного епітопу, антигену або білку.

n) Термін "специфічність" означає число антигенів або антигенних детермінант різних типів, з якими може зв'язуватися конкретний антигензв'язуючий домен поліпептиду відповідно до винаходу. Специфічність антигензв'язуючого білку до будь-якого конкретного антигену/епітопу може бути визначена виходячи з афінності та/або авідності, як зазначено на сторінках 53-56 заявки WO 08/020079 (яка включена у даний опис як посилання), у якій також описані деякі кращі методи визначення рівня зв'язування поліпептиду з відповідним антигеном або епітопом. Звичайно, у кожному антигензв'язуючому білку (такому як поліпептиди відповідно до винаходу), кожний антигензв'язуючий домен може незалежно зв'язуватися зі своїм антигеном/епітопом з константою дисоціації ( $K_D$ ), що становить  $10^{-5}$ - $10^{-12}$  моль/літр або менше, переважно,  $10^{-7}$ - $10^{-12}$  моль/літр або менше, а більш переважно,  $10^{-8}$ - $10^{-12}$  моль/літр (тобто, з константою асоціації ( $K_A$ )  $10^5$ - $10^{12}$  літрів/моль або більше, переважно,  $10^7$ - $10^{12}$  літрів/моль або більше, більш переважно,  $10^8$ - $10^{12}$  літрів/моль). Будь-яка величина  $K_D$ , що становить більше, ніж  $10^4$  моль/літр (або будь-яка величина  $K_A$  менше, ніж  $10^4$   $M^{-1}$  літрів/моль), по суті, розглядається як величина, що вказує на неспецифічне зв'язування. Переважно, біпаратопний поліпептид відповідно до винаходу зв'язується з потрібним антигеном з афінністю менше, ніж 500 нМ, переважно, менше, ніж 200 нМ, більш переважно, менше, ніж 10 нМ, наприклад, менше, ніж 500 нМ. Специфічне зв'язування поліпептиду відповідно до винаходу з CXCR2 може бути визначене будь-яким підходящим методом, відомим *per se*, включаючи, наприклад, аналіз Скетчарда та/або аналізи на конкурентне зв'язування, такі як радіоімуноаналізи (RIA), ферментні імуноаналізи (EIA) та "сендвич"-аналізи на конкурентне зв'язування, та їх різні варіанти, відомі фахівцям *per se*, а також інші згадані у даному документі методи. Як очевидно для фахівця і як зазначено на сторінках 53-56 заявки WO 08/020079, константою дисоціації може бути фактична або гадана константа дисоціації. Методи визначення константи дисоціації відомі фахівцям та включають, наприклад, методи, описані на сторінках 53-56 заявки WO 08/020079.

o) Час напівжиття поліпептиду відповідно до винаходу, зокрема, біпаратопного нанотіла відповідно до винаходу, може бути, в основному, визначений як час, за який концентрація поліпептиду відповідно до винаходу у сироватці знижується на 50% *in vivo*, наприклад, у результаті розкладання поліпептиду та/або кліренсу або секвестрації поліпептиду під дією природних механізмів. Час напівжиття поліпептиду відповідно до винаходу *in vivo* може бути визначений будь-яким відомим способом *per se*, таким як фармакокінетичний аналіз. Підходящі методи відомі фахівцям, та по суті описані, наприклад, у параграфі o) на сторінці 57 заявки WO 08/020079. Як згадується на сторінці 57 заявки WO 08/020079, час напівжиття може бути виражений такими параметрами, як  $t_{1/2}$ -альфа,  $t_{1/2}$ -бета та площа під кривою (AUC). Нижче приводиться посилання на Експериментальну частину, а також на стандартні настанови, такі як Kenneth, A et al.: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and Peters et al, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). Також приводиться посилання на настанову "Pharmacokinetics", M. Gibaldi & D Perron, опубліковану Marcel Dekker, 2nd Rev. edition (1982). Терміни "збільшення часу напівжиття" або "збільшений час напівжиття" відносяться до збільшення  $t_{1/2}$ -бета зі збільшенням або без збільшення  $t_{1/2}$ -альфа, та/або AUC, або того та іншого.

p) У контексті даного винаходу, терміни "блокування, зниження або інгібування" активності CXCR2, визначуваної за допомогою підходящих аналізів *in vitro*, клітинних аналізів або аналізів *in vivo*, може означати або блокування, або зниження, або інгібування релевантної або передбачуваної біологічної активності CXCR2, щонайменше на 1%, переважно, щонайменше на 5%, наприклад, щонайменше на 10% або щонайменше на 25%, наприклад, щонайменше на 50%, щонайменше на 60%, щонайменше на 70%, щонайменше на 80% або на 90%, або більше у порівнянні з активністю CXCR2 у тому ж самому аналізі та у тих же самих умовах, але за

відсутності поліпептиду відповідно до винаходу.

Як очевидно для фахівця у даній галузі, термін "інгібування" може також включати зниження афінності, авідності, специфічності та/або селективності CXCR2 стосовно одного або декількох його лігандів, або партнерів по зв'язуванню та/або зниження чутливості CXCR2 для одного або декількох умов у середовищі, або в оточенні, у якому є присутнім CXCR2 (таких як pH, іонна сила, присутність кофакторів тощо) у порівнянні з тими ж самими умовами, але за відсутності поліпептиду відповідно до винаходу. Як очевидно для фахівця у даній галузі, таке інгібування може бути також визначене будь-яким підходящим методом та/або за допомогою будь-якого підходящого аналізу, відомого *per se*, залежно від розглянутої мішені або розглянутого антигену.

q) Використовуваний у даному документі термін "модуляція" може означати алостеричну модуляцію CXCR2; та/або зниження рівня зв'язування або інгібування зв'язування CXCR2 з одним з його лігандів, та/або конкурування із природним лігандом за зв'язування з CXCR2. Модуляція може також, наприклад, включати зміну укладання або конформації CXCR2, або надання здатності CXCR2 змінювати свою конформацию (наприклад, після зв'язування з лігандом) для зв'язування з іншими одиницями (субодиницями) або для дисоціації від цих одиниць (субодиниць). Модуляція може також включати, наприклад, зміну здатності CXCR2 транспортувати інші сполуки або слугувати як канал для інших сполук (таких як іони).

Модуляція, зокрема, інгібування або зниження активності CXCR2 під дією поліпептидів відповідно до винаходу, а саме, біпаратонних нанотіл відповідно до винаходу, може бути оборотною або необоротною, однак, для їхнього використання у фармацевтиці та у фармакології, бажано, щоб таке інгібування або зниження активності CXCR2 було оборотним.

r) Поліпептид відповідно до винаходу вважається "специфічним" стосовно CXCR2 у порівнянні із другою мішенню або антигеном, якщо він зв'язується з CXCR2 з афінністю (описаною вище та що виражається як величина  $K_D$ , величина  $K_A$ , константа швидкості дисоціації  $K_{off}$  та/або константа швидкості асоціації  $K_{on}$ ), яка щонайменше у 10 разів, наприклад, щонайменше у 100 разів переважно, щонайменше у 1000 разів і до 10000 разів або більше перевищує афінність зв'язування із другою мішенню або поліпептидом. Так, наприклад, поліпептид відповідно до винаходу може зв'язуватися з CXCR2 з величиною  $K_D$ , яка щонайменше у 10 разів, наприклад, щонайменше у 100 разів, переважно, щонайменше у 1000 разів, наприклад, у 10000 разів або т.п. менше величини  $K_D$  для зв'язування з іншою мішенню або з іншим поліпептидом, або епітопом.

s) Використовувані у даному описі терміни "перехресно блокувати", "перехресно блокований" та "перехресне блокування" є синонімами та відносяться до здатності одного варіабельного домену імуноглобуліну або поліпептиду негативно впливати на зв'язування інших окремих варіабельних доменів імуноглобуліну, або поліпептидів відповідно до винаходу з даною мішенню. Ступінь впливу одного варіабельного домену імуноглобуліну або поліпептиду відповідно до винаходу на зв'язування з іншою мішенню, яке можна назвати перехресним блокуванням відповідно до винаходу, може бути визначена за допомогою аналізу на конкурентне зв'язування. У одному особливо підходящому кількісному аналізі на перехресне блокування застосовується FACS- або ELISA-метод оцінки конкурентного зв'язування міченого (наприклад, His-міченого, радіоактивно міченого або флуоресцентно міченого) одного варіабельного домену імуноглобуліну або поліпептиду відповідно до винаходу та іншого зв'язуючого агенту з мішенню. У експериментальній частині, по суті, описаний підходящий аналіз на основі FACS та ELISA із заміщенням, проведений для того, щоб визначити, чи може зв'язуюча молекула перехресно блокувати один варіабельний домен імуноглобуліну або поліпептид відповідно до винаходу, або вона перехресно блокує такий домен або поліпептид. Слід зазначити, що у цьому аналізі можуть бути використані будь-які описані у даному документі окремі варіабельні домени імуноглобуліну або інші зв'язуючі агенти. Таким чином, в основному, амінокислотна послідовність, що перехресно блокує, або інший зв'язуючий агент відповідно до винаходу являють собою послідовність або агент, які будуть зв'язуватися з мішенню у вищевказаному аналізі на перехресне блокування, таким чином, щоб під час проведення аналізу та у присутності другої амінокислотної послідовності або іншого зв'язуючого агенту відповідно до винаходу, зареєстроване заміщення одного варіабельного домену імуноглобуліну або поліпептиду відповідно до винаходу становило 50% - 100% від максимального теоретичного заміщення під дією передбачуваного тестованого перехресно блокувального агенту (наприклад, іншого фрагменту антитіла,  $V_{HH}$ , dAb або аналогічного варіанту  $V_H/V_L$ ).

t) Вважається, що поліпептид відповідно до винаходу "перехресно реагує" із двома різними антигенами або з антигенними детермінантами (такими як сироватковий альбумін або CXCR2 від ссавців двох різних видів, таких як людей та собакоподібна мавпа), якщо він є специфічним



(як визначено у даному описі) стосовно цих різних антигенів або антигенних детермінантів.

у) Визначений у даному описі термін "консервативні амінокислотні заміни" означає амінокислотні заміни, при яких один амінокислотний залишок замінюють іншим амінокислотним залишком, який має аналогічну хімічну структуру, та який впливає або, по суті, не виявляє якого-небудь впливу на функцію, активність або інші біологічні властивості зазначеного поліпептиду. Такі консервативні амінокислотні заміни добре відомі фахівцям та описані, наприклад, у WO 04/037999, GB-A-3357768, WO 98/49185, WO 00/46383 і WO 01/09300; та (кращі) типи та/або комбінації таких замінів можуть бути вибрані виходячи з відповідного опису у заявці WO 04/037999, а також у заявці WO 98/49185 та у інших роботах, що цитуються у цих заявках.

Такими консервативними замінами, переважно, є заміни, де одна амінокислота, що входить у нижченаведені групи (а)-(е), замінена іншим амінокислотним залишком, що належить до тієї ж самої групи, де зазначеними групами є: (а) невеликі аліфатичні неполярні або слабополярні залишки: Ala, Ser, Thr, Pro та Gly; (b) полярні негативно заряджені залишки та їх (незаряджені) аміді: Asp, Asn, Glu та Gln; (c) полярні, позитивно заряджені залишки: His, Arg та Lys; (d) великі аліфатичні неполярні залишки: Met, Leu, Ile, Val та Cys; та (е) ароматичні залишки: Phe, Tyr та Trp.

Особливо кращими консервативними замінами є наступні заміни: Ala на Gly або на Ser; Arg на Lys; Asn на Gln або на His; Asp на Glu; Cys на Ser; Gln на Asn; Glu на Asp; Gly на Ala або на Pro; His на Asn або на Gln; Ile на Leu або на Val; Leu на Ile або на Val; Lys на Arg, на Gln або на Glu; Met на Leu, на Tyr або на Ile; Phe на Met, на Leu або на Tyr; Ser на Thr; Thr на Ser; Trp на Tyr; Tyr на Trp; та/або Phe на Val, на Ile або на Leu.

в) Як використовується у даному описі CDR являє собою гіперваріабельну область поліпептидів відповідно до винаходу. CDR являє собою фрагмент із амінокислот, які, якщо вони присутні окремо або в комбінації з однією або декількома іншими CDR, визначають комплементарність із антигеном(ами) або епітопом(ами), які розпізнають поліпептид відповідно до винаходу. CDR ідентифікують у амінокислотних послідовностях відповідно до певних угод про нумерацію. У формулі винаходу та у конкретному описі даної заявки використовується нумерація Kabat.

w) Використовуваний у даному документі термін "FR" означає каркасну область (іноді позначувану FW). Каркасні області являють собою амінокислотні фрагменти, які фланкують одну або декілька CDR та зберігають їхню правильну тривимірну конформацію, необхідну для розпізнавання антигену або епітопу. FR не мають специфічності до антигену або до епітопу мішені, але є специфічними для молекул імуноглобуліну певного виду або типу, у яких вони присутні. Як докладно обговорюється нижче, у поліпептидах відповідно до винаходу, амінокислотні послідовності каркасної області повинні бути сконструйовані таким чином, щоб вони відрізнялися від каркасної послідовності, що походить від джерела імуноглобуліну, наприклад, верблюда.

x) Використовуваний у даному документі термін "CXCR2" означає цитокіновий рецептор, який є присутнім щонайменше на поверхні лейкоцитів, та природними лігандами якого можуть бути GRO- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , IL-8, ENA-78 або GCP-2. Використовуваний у даному документі термін "CXCR2", по суті, означає будь-який білок, що має функцію CXCR2, незалежно від джерела його походження. Однак, використовуваний у даному описі термін "CXCR2 людини" означає білок, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1, або будь-який його алельний варіант або ортолог, а термін "CXCR2 собакоподібних мавп" означає білок, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, або будь-який його алельний варіант, або ортолог.

y) Використовуваний у даному описі термін "оптимізація послідовності" означає добір найбільш сприятливих замінів, інсерцій або делецій для введення в амінокислотну послідовність із метою збереження або повідомлення конкретних властивостей або структурних особливостей, які можуть бути відсутніми у нативній послідовності. Такі заміни, інсерції або делеції можуть бути введені, наприклад, з метою хімічної стабілізації, поліпшення технологічних властивостей, запобігання утворенню піроглютамату або запобігання окиснення або ізомеризації. Методи оптимізації таких властивостей, які можуть бути застосовані для біпаратопних поліпептидів, зокрема, біпаратопних нанотіл відповідно до винаходу, описані у заявці WO 2009/095235, яка вводиться у даний опис за допомогою посилання. Методи оптимізації послідовностей можуть бути також здійснені з метою гуманізації біпаратопного поліпептиду відповідно до винаходу описаним у даному документі способом. Таким чином, при використанні кожного з термінів "оптимізація послідовностей", "оптимізувати послідовність" або "оптимізована послідовність" мається на увазі, що вони відносяться до конкретних замінів або інсерцій, введених з метою гуманізації, або до частково або повністю гуманізованих біпаратопних поліпептидів, переважно, до біпаратопних нанотіл.

## Докладний опис винаходу

Як вказувалося вище, у першому аспекті даний винахід відноситься до поліпептиду, що містить щонайменше два антигензв'язуючих домени імуноглобуліну, де поліпептид спрямований проти хемокінового рецептору CXCR2 або зв'язується із цим рецептором, та де зазначений поліпептид включає перший антигензв'язуючий домен, що розпізнає перший епітоп на CXCR2, та другий антигензв'язуючий домен, що розпізнає другий епітоп на CXCR2.

Кращий поліпептид відповідно до винаходу містить перший антигензв'язуючий домен, здатний зв'язуватися з лінійним пептидом, що складається із амінокислотної послідовності SEQ ID NO:7, та другий антигензв'язуючий домен, який або не здатний зв'язуватися із зазначеним лінійним пептидом, або зв'язується із цим пептидом з меншою афінністю. SEQ ID NO:7 являє собою перші 19 N-кінцевих амінокислот CXCR2 людини.

У одному з варіантів здійснення винаходу перший антигензв'язуючий домен розпізнає перший епітоп, що містить область із 1-19 амінокислот CXCR2 або що входить у цю область, а зазначений другий антигензв'язуючий домен розпізнає другий епітоп на CXCR2, що знаходиться за межами амінокислот 1-19.

Перший та другий антигензв'язуючі домени можуть бути у одній або декількох амінокислотних послідовностях, характерних для молекули класу імуноглобулінів. Так, наприклад, ці пептиди або поліпептиди можуть містити стандартне чотириланцюгове антитіло, приєднане за допомогою лінкеру. Зокрема, поліпептид відповідно до винаходу може являти собою поліпептид, у якому зазначені перший та другий антигензв'язуючі домени присутні у першому та другому антитілах, відповідно, кожне з яких містить два важкі та два легкі ланцюги, де зазначені перше та друге антитіла зв'язані за допомогою лінкеру. Альтернативно, зазначені перший та другий антигензв'язуючі домени можуть бути у одному антитілі, що містить два важкі та два легкі ланцюги.

У альтернативному варіанті здійснення винаходу перший та другий антигензв'язуючі домени містяться у амінокислотних послідовностях, які являють собою антитіла з важким ланцюгом, зокрема, поліпептидом відповідно до винаходу може бути поліпептид, у якому зазначений перший антигензв'язуючий домен міститься у першому антитілі з важким ланцюгом, а зазначений другий антигензв'язуючий домен знаходиться у другому антитілі з важким ланцюгом, де зазначені перше та друге антитіла з важким ланцюгом зв'язані за допомогою лінкеру. Такі антитіла з важким ланцюгом можуть походити від тваринних сімейства верблужих та містять, по своїй природі, тільки два важкі ланцюги, кожний з яких містить константну та варіабельну область. У даному винаході також розглядається поліпептид, у якому зазначені перший та другий зв'язуючі домени присутні у одному антитілі з важким ланцюгом, що містить два важкі ланцюги.

У іншому альтернативному варіанті здійснення винаходу, пептиди або поліпептиди, що містять перший та другий зв'язуючі домени, можуть являти собою одноланцюговий Fv (scFv). Ці пептиди або поліпептиди містять лінійні злиті  $V_L$ - та  $V_H$ -домени. Відповідно до цього, поліпептиду відповідно до винаходу може бути поліпептид, де перший та другий антигензв'язуючі домени присутні у першому та другому одноланцюгових Fv-фрагментах (scFv) антитіла, відповідно, та де зазначені перший та другий scFv-фрагменти зв'язані за допомогою лінкеру.

У іншому альтернативному варіанті здійснення винаходу перший та другий антигензв'язуючі домени можуть міститися у одному або декількох Fab або  $F(ab)_2$ -фрагментах стандартного чотириланцюгового антитіла. Fab-фрагмент містить один константний домен та один варіабельний домен, що походить від кожного одного важкого та одного легкого ланцюгу стандартного антитіла.  $F(ab)_2$ -фрагмент містить два Fab-фрагменти, зв'язані частиною шарнірної області стандартного антитіла. Зокрема, поліпептидом відповідно до винаходу може бути поліпептид, де зазначені перший та другий антигензв'язуючі домени присутні у першому та другому Fab- або  $F(ab)_2$ -фрагментах антитіла, відповідно, та де зазначені перший та другий Fab- або  $F(ab)_2$ -фрагменти зв'язані за допомогою лінкеру. У такому варіанті винаходу, зазначений перший антигензв'язуючий домен може міститися у Fab-фрагменті антитіла, а зазначений другий антигензв'язуючий домен міститься у  $F(ab)_2$ -фрагменті або навпаки.

У кращому варіанті здійснення винаходу перший антигензв'язуючий домен міститься у одному варіабельному домені першого імуноглобуліну, а зазначений другий антигензв'язуючий домен міститься у одному варіабельному домені другого імуноглобуліну.

У конкретному прикладі цього варіанту здійснення винаходу перший та другий антигензв'язуючі домени містяться у однодоменному антитілі, позначуваному d(ab). Антитіла d(ab) містять один  $V_L$ -домен або один  $V_H$ -домен, що походить від стандартних антитіл. Таким чином, поліпептидом відповідно до винаходу може бути поліпептид, де зазначені перший та

другий антигензв'язуючі домени містяться у першому та другому доменних антитілах (dAb), та де зазначені перше та друге dAb зв'язані за допомогою лінкеру. Зазначені перше та друге dAb можуть являти собою  $V_L$ -фрагменти або  $V_H$ -фрагменти антитіла. У даному варіанті здійснення винаходу зазначений перший антигензв'язуючий домен може міститися у  $V_L$ -фрагменті, а зазначений другий антигензв'язуючий домен може міститися у  $V_H$ -фрагменті, або навпаки.

Загальний опис (одно)доменних антитіл можна також знайти у EP 0368684. Визначення терміну "dAb" можна знайти у публікації Ward et al. (Nature 1989 Oct 12; 341 (6242): 544-6), Holt et al., Trends Biotechnol., 2003, 21(11):484-490; а також, наприклад, у заявках WO 06/030220, WO 06/003388 та у інших опублікованих патентних заявках Domantis Ltd. Слід також зазначити, що хоча однодоменні антитіла або окремі варіабельні домени можуть бути отримані від акул деяких видів (наприклад, так звані "домени IgNAR", див., наприклад, WO 05/18629), однак, з погляду даного винаходу, вони є менш кращими, оскільки вони не походять від ссавців.

Варіабельна область одного ланцюгу такого антитіла з важким ланцюгом відома як  $V_{HH}$ -домен та містить фрагмент антитіла, відомий як нанотіло. Нанотіло може містити весь  $V_{HH}$ -домен або його фрагмент. Загальний опис антитіл з важким ланцюгом та їх варіабельних доменів можна знайти у попередній заявці WO08/020079 на сторінці 59 та списку робіт, опублікованих на стор. 41-43 Міжнародної заявки WO06/040153.  $V_{HH}$ -домени мають ряд унікальних структурних особливостей та функціональних властивостей, які дозволяють одержати виділені  $V_{HH}$ -домени (а також нанотіла на їхній основі, що мають функціональні та структурні властивості, аналогічні структурним та функціональним властивостям природних  $V_{HH}$ -доменів), та поліпептиди, що мають такі ж у високому ступені кращі властивості, як і функціональні антигензв'язуючі домени або поліпептиди. Зокрема,  $V_{HH}$ -домени (які були "сконструйовані" відповідно до їхньої природної здатності функціонально зв'язуватися з антигеном за відсутності варіабельного домену легкого ланцюгу або без якої-небудь взаємодії із цим доменом), та нанотіла можуть функціонувати як одна відносно невелика функціональна антигензв'язуюча структурна одиниця, домен або білок. Використовуваний у даному документі термін "нанотіло" охоплює не тільки природні  $V_{HH}$ -домени та їх фрагменти, але також і їхні варіанти та похідні, докладно обговорювані нижче.

У найбільш кращому варіанті здійснення винаходу біпаратопним поліпептидом відповідно до винаходу є поліпептид, де зазначений перший антигензв'язуючий домен міститься у першому нанотілі, а зазначений другий антигензв'язуючий домен присутній у другому нанотілі, та де зазначені перше та друге нанотіла зв'язані за допомогою лінкеру.

Структура  $V_{HH}$ -домену може бути представлена як:

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

а біпаратопний поліпептид відповідно до винаходу може мати одну з представлених нижче структур:

i) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-лінкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8

ii) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-лінкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8-лінкер-HLE

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

де: якщо FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 містить перший антигензв'язуючий домен (що зв'язується з лінійною SEQ ID NO:7), тоді FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 містить другий антигензв'язуючий домен (що не зв'язується з лінійною SEQ ID NO:7), а якщо FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 містить другий антигензв'язуючий домен (що не зв'язується з лінійною SEQ ID NO:7), тоді FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 містить перший антигензв'язуючий домен (що зв'язується з лінійною SEQ ID NO:7), а HLE являє собою зв'язуючу одиницю, що сприяє збільшенню часу напівжиття *in vivo*.

Відповідно до цього, використовуваний у даному документі термін "біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу" означає поліпептид, що містить два окремі нанотіла, зв'язані за допомогою лінкеру.

Однак біпаратопні нанотіла відповідно до винаходу можуть містити лише одну CDR у кожному нанотілі. Якщо це має місце, то кращою CDR є CDR3 та/або CDR6. Однак біпаратопні нанотіла відповідно до винаходу можуть являти собою CDR1 або CDR2, або CDR3, або CDR1 та CDR2, або CDR1 та CDR3, або CDR2 та CDR3, або CDR1 та CDR2, та CDR3 у N-кінцевому нанотілі та кожен з нижченаведених комбінацій у C-кінцевому нанотілі: CDR4 або CDR5, або CDR6, або CDR4 і CDR5, або CDR4 і CDR6, або CDR5 і CDR6, або CDR4 і CDR5, і CDR6. Як вказувалося вище, біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу може містити всі CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 і CDR6, де кожна CDR фланкована FR.

FR можуть мати амінокислотні послідовності, що відповідають вихідній верблужій

послідовності. Однак, у кращих варіантах здійснення винаходу, одна або декілька FR мають щонайменше одну послідовність-оптимізуючу амінокислотну заміну, при цьому, переважно, щоб одна або декілька, переважно, усі FR були частково або повністю гуманізованими. Заміни для оптимізації послідовності більш докладно обговорюються нижче.

Також вказувалося, що у варіантах здійснення даного винаходу, у яких перший та другий антигензв'язуючі домени знаходяться у окремих варіабельних доменах першого та другого імуноглобуліну, що не є нанотілами, та у доменах або фрагментах стандартних антитіл, обговорюваних вище, наприклад, людських антитіл, доменів або фрагментів, область CDR може бути модифікована шляхом введення в неї щонайменше однієї заміни верблужим залишком та продукувати, але необов'язково, повністю верблужі CDR.

Як описано у даній заявці, загальне число амінокислотних залишків у одному нанотілі може становити в межах 110-120 залишків, переважно, 112-115 залишків, найбільш переважно, 113 залишків. Однак слід зазначити, що частини, фрагменти, аналоги або похідні (як докладно описано нижче) нанотіла не мають конкретних обмежень по їхній довжині та/або розміру, за умови, що такі частини, фрагменти, аналоги або похідні будуть задовольняти зазначеним у даному документі вимогам та можуть також виявитися кращими для досягнення описаних у даному документі цілей.

Як описано у даній заявці, амінокислотні залишки нанотіла пронумеровані відповідно до загальної системи нумерації  $V_H$ -доменів, запропонованої Kabat та ін. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication NO:91), та застосовуваної до верблужих  $V_{HH}$ -доменів, описаних у статті Riechmann and Muyldermans, J. Immunol. Methods 2000 Jun 23; 240 (1-2): 185-195 (див., наприклад, фігуру 2 цієї публікації), та відповідно, FR1 нанотіла може містити амінокислотні залишки у положеннях 1-30; CDR1 нанотіла може містити амінокислотні залишки у положеннях 31-35; FR2 нанотіла може містити амінокислотні залишки у положеннях 36-49; CDR2 нанотіла може містити амінокислотні залишки в положеннях 50-65; FR3 нанотіла може містити амінокислотні залишки у положеннях 66-94; CDR3 нанотіла може містити амінокислотні залишки в положеннях 95-102; і FR4 нанотіла може містити амінокислотні залишки у положеннях 103-113. У кращому біпаратопному нанотілі відповідно до винаходу, N-кінцеве нанотіло може мати FR та CDR у положеннях, зазначених вище, а у C-кінцевому нанотілі, FR5 нанотіла може містити амінокислотні залишки у положеннях 1-30; CDR4 нанотіла може містити амінокислотні залишки у положеннях 31-35; FR6 нанотіла може містити амінокислотні залишки у положеннях 36-49; CDR5 нанотіла може містити амінокислотні залишки у положеннях 50-65; FR7 нанотіла може містити амінокислотні залишки у положеннях 66-94; CDR6 нанотіла може містити амінокислотні залишки у положеннях 95-102; та FR8 нанотіла може містити амінокислотні залишки у положеннях 103-113.

Однак слід зазначити, що CDR та FR у антитілі, зокрема, у нанотілі, можуть бути ідентифіковані відповідно до систем нумерації, яка є альтернативою системі Kabat. Такими системами є системи нумерації за Chothia, системи нумерації IMGT та Aho. Ідентифікація положень CDR або FR будь-якої однієї з амінокислотних послідовностей, зазначених у таблицях 9, 13, 19, 32, 33 і 34, та пронумерованих відповідно до цих альтернативних систем нумерації, може бути здійснена за допомогою аналізу послідовностей. Для цього можна звернутися до наступних web-сайтів: <http://www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/> (Chothia); <http://imqt.cines.fr> (IMGT) і <http://www.bio.uzh.ch/antibody/index.html> (Aho). Зокрема, у кращих описаних у даному документі біпаратопних нанотілах відповідно до винаходу, CDR 1, 2, 3, 4, 5 або 6 можуть бути визначені відповідно до однієї із цих систем нумерації, які є альтернативою системі нумерації Kabat, але які все-таки входять у обсяг даного винаходу.

CDR за Chothia для деяких нанотіл відповідно до винаходу представлено у таблиці 35.

Нанотіла можуть належати до так званого "класу  $V_H3$ " (тобто до класу нанотіл, що мають послідовності, у високому ступені гомологічні послідовностям зародкової лінії людини класу  $V_H3$ , таких як DP-47, DP-51 або DP-29), де зазначені нанотіла є кращими для конструювання біпаратопних нанотіл відповідно до винаходу. Однак, слід зазначити, що нанотіло будь-якого типу, спрямоване проти CXCR2, та, наприклад, нанотіла, що належать до так званого "класу  $V_H4$ " (тобто до класу нанотіл, що мають послідовності, у високому ступені гомологічні послідовностям зародкової лінії людини класу  $V_H4$ , таких як DP-78), та описані, наприклад, у WO 07/118670, можуть бути також використані для конструювання біпаратопних нанотіл відповідно до винаходу.

Лінкерна молекула, яка з'єднує один або кілька пептидів або поліпептидів, що містять перший та другий антигензв'язуючі домени відповідно до винаходу, може походити, а може й не походити від імуноглобуліну. Якщо поліпептидом відповідно до винаходу є один варіабельний домен біпаратопного імуноглобуліну, наприклад, нанотіла, тоді лінкер з'єднує C-кінець одного

варіабельного домену одного імуноглобуліну, що містить антигензв'язуючий домен, з N-кінцем одного варіабельного домену іншого імуноглобуліну, що містить антигензв'язуючий домен.

Підходящі спейсери або лінкери, використовувані у біпаратопних поліпептидах відповідно до винаходу для зв'язування першого та другого антигензв'язуючих доменів, зокрема, двох нанотіл, відомі фахівцям у даній галузі, та ними можуть бути, в основному, будь-який лінкер або спейсер, використовуваний для зв'язування амінокислотних послідовностей. При цьому, переважно, щоб зазначений лінкер або спейсер був придатний для конструювання білків або поліпептидів, використовуваних у фармацевтиці.

Так, наприклад, лінкером може бути підходяща амінокислотна послідовність, зокрема, амінокислотні послідовності, що складаються із 1-50, переважно, 1-30, наприклад, 1-10 амінокислотних залишків. Деякими кращими прикладами таких амінокислотних послідовностей є лінкери gly-ser, наприклад, лінкери типу  $(\text{gly}_x\text{ser}_y)_z$ , такі як, наприклад,  $(\text{gly}_4\text{ser})_3$  або  $(\text{gly}_3\text{ser}_2)_3$ , описані у WO 99/42077, та лінкери GS30, GS15, GS9 і GS7, описані у згаданих у даному документі заявках Ablynx (див., наприклад, WO 06/040153 та WO 06/122825), а також області, подібні шарнірним областям, такі як шарнірні області природних антитіл з важкими ланцюгами або аналогічні послідовності (такі як послідовності, описані у WO 94/04678).

Деякі інші лінкери можуть являти собою поліаланінові лінкери (такі як AAA), а також лінкери GS30 (SEQ ID NO:85 у WO 06/122825) та GS9 (SEQ ID NO:84 у WO 06/122825).

Кращими лінкерами відповідно до винаходу є пептидні лінкери, що мають довжину 3-50 амінокислот, наприклад, лінкери довжиною 3-9, 10-15, 16-20, 21-25, 26-35, 36-40, 41-45 або 46-50 амінокислот. У одному з варіантів винаходу, пептидний лінкер має довжину у 35 амінокислот. Лінкер може складатися тільки із двох різних амінокислот. Як загадувалося вище, такими лінкерами можуть бути гліцин та серин. Альтернативно, такими лінкерами можуть бути пролін та серин.

25 У деяких варіантах здійснення винаходу, зокрема, у біпаратопних нанотілах відповідно до винаходу, пептидний лінкер складається з амінокислотної послідовності: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO:220).

Інші підходящі лінкери звичайно включають органічні сполуки або полімери, зокрема, сполуки або полімери, що підходять для білків, які можуть бути використані у фармацевтичних цілях. Так, наприклад, поліетиленгліколеві молекули були використані для зв'язування доменів антитіл, див., наприклад, WO 04/081026.

Таким чином, у іншому своєму аспекті, даний винахід відноситься до молекули, що містить щонайменше два поліпептиди, де молекула спрямована проти хемокінового рецептора CXCR2 або зв'язується із цим рецептором, та де перший поліпептид містить перший антигензв'язуючий домен імуноглобуліну, а другий поліпептид містить другий антигензв'язуючий домен імуноглобуліну, де зазначені перший та другий антигензв'язуючі домени розпізнають перший та другий епітопи на CXCR2, та де зазначені щонайменше два поліпептиди зв'язані за допомогою не-пептидного лінкеру.

40 Переважно, у одному з аспектів здійснення винаходу, перший антигензв'язуючий домен здатний зв'язуватися з лінійним пептидом, що складається із амінокислотної послідовності SEQ ID NO:7, а зазначений другий антигензв'язуючий домен або не зв'язується із зазначеним лінійним пептидом, або зв'язується із цим пептидом з меншою афінністю. Переважно, перший епітоп містить амінокислоти 1-19 CXCR2 або входить у зазначену область амінокислот, а другий епітоп знаходиться за межами амінокислот 1-19 CXCR2.

45 Переважно, у цьому аспекті здійснення винаходу перший та другий антигензв'язуючі домени містяться у окремих варіабельних доменах імуноглобуліну, де зазначені перший та другий окремі варіабельні домени імуноглобуліну, переважно, являють собою нанотіла, зокрема, кожне з нанотіл, конкретно описаних у даній заявці.

У всіх описаних у даному документі аспектах винаходу, важливими властивостями лінкеру є його довжина та конформація, що дозволяють першому та другому антигензв'язуючим доменам зв'язуватися з їхніми відповідними епітопами на CXCR2.

Використовуваний(і) лінкер(и) може (можуть) також надавати поліпептидам відповідно до винаходу одну або декілька інших сприятливих властивостей або функцій, та/або вводити один або кілька сайтів для утворення похідних, та/або для приєднання функціональних груп (наприклад, як описано у даній заявці для похідних біпаратопних нанотіл відповідно до винаходу). Так, наприклад, лінкери, що містять один або кілька заряджених амінокислотних залишків (див. таблицю А-2 на сторінці 48 Міжнародної заявки WO 08/020079), можуть надавати поліпшених гідрофільних властивостей, а лінкери, які утворюють або містять невеликі епітопи або мітки, можуть бути використані для детектування, ідентифікації та/або очищення. І в цьому випадку, виходячи з опису даної заявки, фахівець може самостійно вибрати оптимальні лінкери.

що підходять для використання у конкретному поліпептиді відповідно до винаходу, після проведення, але необов'язково, невеликого числа нетрудомістких рутинних експериментів.

І нарешті, якщо у поліпептидах відповідно до винаходу використовуються два або більше лінкерів, тоді ці лінкери можуть бути однаковими або різними. І у цьому випадку, виходячи з опису даної заявки, фахівець може самостійно вибрати оптимальні лінкери, що підходять для використання у конкретному поліпептиді відповідно до винаходу, після проведення, але необов'язково, невеликого числа нетрудомістких рутинних експериментів.

Звичайно, для полегшення експресії та одержання, у даному винаході використовується лінійний поліпептид. Однак, у самому широкому сенсі, даний винахід не обмежується таким поліпептидом. Так, наприклад, якщо поліпептид відповідно до винаходу містить три або більше нанотіл, тоді вони можуть бути зв'язані за допомогою лінкеру, що має три або більш "області", де кожна область пов'язана з нанотілом та утворює конструкцію у формі "зірки". Така конструкція також може бути використана, хоча, звичайно, вона є менш кращою, ніж кільцева конструкція.

Зокрема, може бути отримана будь-яка структура, що складається із двох або більше нанотіл з одним або декількома лінкерами, ідентифікованими вище. Так, наприклад, може бути розглянуте біпаратопне біспецифічне нанотіло, що містить два зв'язуючі домени імуноглобуліну, які спрямовані проти CXCR2 або які зв'язуються з ним, та один або декілька зв'язуючих доменів імуноглобуліну, які спрямованих проти альбуміну сироватки людини (HSA) або які зв'язуються з ним, де зазначений HSA-зв'язуючий домен може бути присутнім разом з нанотілом, яке приєднано до CXCR2-зв'язуючих нанотіл у будь-якому положенні, наприклад, між двома CXCR2-зв'язуючими нанотілами, за допомогою лінкерів, визначених вище.

Авторами даної заявки бути отримані біпаратопні поліпептиди відповідно до даного винаходу. Амінокислотні послідовності мультивалентних та біпаратопних анти-CXCR2 нанотіл представлено у таблиці 13 у розділі "Приклади". Із цих поліпептидів, особливо кращими поліпептидами відповідно до винаходу є біпаратопні нанотіла, представлені у таблиці 13 як 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 та 163E3-2B2, а також 127D1-97A9, 54B12-97A9 та 97A9-127D1 та їх варіанти з оптимізованою послідовністю. Усі зазначені біпаратопні нанотіла містять перше нанотіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, здатний зв'язуватися з лінійним пептидом, що складається із амінокислотної послідовності SEQ ID NO:7 (амінокислоти 1-19 CXCR2), та друге нанотіло, що містить другий антигензв'язуючий домен, який або не зв'язується із зазначеним лінійним пептидом, або зв'язується із цим пептидом з меншою афінністю (див. таблицю 8). Особливо кращими поліпептидами відповідно до винаходу є 163D2-127D1, 163E3-127D1, 163E3-54B12, 163D2-54B12, 2B2-163E3, 2B2-163D2, 97A9-2B2 і 97A9-54B12.

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

Цей варіант здійснення винаходу відноситься до біпаратопного нанотіла, де зазначене друге нанотіло, визначене вище, містить щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:145, 165 та 185, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:145, 165 або 185, та де зазначене перше нанотіло включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:141, 161 та 181, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:141, 161 або 181.

Біпаратопне нанотіло, переважно, має структуру:

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

де у зазначеному другому нанотілі, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:145, CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:165, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:185, та де у зазначеному першому нанотілі, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:141, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:161, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:181, або де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90%, або щонайменше на 95% ідентичні будь-якій одній з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:145, 165, 185, 141, 161 або 181.

Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від послідовностей, представлених у будь-якій з SEQ ID NO:145, 165, 185, 141, 161 або 181, тільки консервативними амінокислотними замінами. Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких зазначених вище послідовностей ID тільки однією, двома або трьома амінокислотами.

У кращому варіанті здійснення даного аспекту винаходу FR1 містить амінокислотну

послідовність SEQ ID NO:83, FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:104, FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:124, FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131, FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:79, FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:100, FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:120 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

У альтернативному варіанті FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 і FR8 можуть мати амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні будь-якій амінокислотній послідовності з SEQ ID NO:83, 104, 124, 131, 79, 100 або 120.

Так, наприклад, у цьому аспекті здійснення винаходу FR1 та/або FR4 можуть містити будь-які амінокислотні послідовності з SEQ ID NO:70-89; FR2 та/або FR5 можуть містити будь-які амінокислотні послідовності з SEQ ID NO:91-110; FR3 та/або FR6 можуть містити будь-які амінокислотні послідовності з SEQ ID NO:111-130; та FR4 та/або FR8 можуть містити будь-які амінокислотні послідовності з SEQ ID NO:131-133.

У особливо кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:58, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:58.

У іншому варіанті здійснення даного аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:58, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична послідовності SEQ ID NO:58 або щонайменше на 80% ідентична каркасним областям, пронумерованим за Kabat, де зазначене біпаратопне нанотіло може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

У іншому кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу, біпаратопне нанотіло містить, в основному, послідовності CDR, які представлені у SEQ ID NO:58, але які були модифіковані у каркасних областях таким чином, щоб вони включали одну або декілька послідовностей-оптимізуючих замін, переважно, одну або декілька замін, зазначених у таблиці 28 для нанотіла 163D2 та у таблиці 26 для нанотіла 127D1. Нанотіло 163D2, переважно, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:218, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:218, а нанотіло 127D1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:216 або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:216. Так, наприклад, каркасні області цих нанотіл можуть мати послідовність каркасних областей FR1, FR2, FR3 або FR4, пронумерованих за Kabat, та представлених у будь-якій з SEQ ID NO:213-219 у таблиці 32. Переважно, таке біпаратопне нанотіло з оптимізованою послідовністю може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

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

Цей варіант здійснення винаходу відноситься до біпаратопного нанотіла, де зазначене друге нанотіло містить щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:146, 166 та 186, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:146, 166 та 186, та де зазначене перше нанотіло включає щонайменше одну CDR, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:141, 161 та 181, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:141, 161 або 181.

Біпаратопне нанотіло, переважно, має структуру:

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

де у зазначеному другому нанотілі, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:146; CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:166; а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:186, та де у зазначеному першому нанотілі, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:141; CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:161, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:181 або де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90%, або щонайменше на 95% ідентичні будь-якій одній з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:146, 166, 186, 141, 161 або 181.

Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від послідовностей SEQ ID NO:146, 166, 186, 141, 161 або 181, тільки консервативними амінокислотними замінами. Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких зазначених вище послідовностей ID тільки однією, двома або трьома амінокислотами.

У кращому варіанті здійснення даного аспекту винаходу FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:84, FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:105, FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:125, FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131, FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:79, FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:100, FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:120 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

У альтернативному варіанті, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 можуть мати амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:84, 105, 125, 131, 79, 100 або 120.

Наприклад, у цьому аспекті здійснення винаходу, FR1 та/або FR4 можуть містити будь-які амінокислотні послідовності з SEQ ID NO:70-89; FR2 та/або FR5 можуть містити будь-які амінокислотні послідовності з SEQ ID NO:91-110; FR3 та/або FR6 можуть містити будь-які амінокислотні послідовності з SEQ ID NO:111-130; та FR4 та/або FR8 можуть містити будь-які амінокислотні послідовності з SEQ ID NO:131-133.

У кращому варіанті здійснення аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:59, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:59.

У одному з варіантів цього аспекту винаходу, біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:59, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична послідовності SEQ ID NO:59 або щонайменше на 80% ідентична каркасним областям, пронумерованим за Kabat, де зазначене біпаратопне нанотіло може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

У іншому кращому варіанті здійснення даного аспекту винаходу біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить, в основному, послідовності CDR, які представлені у SEQ ID NO:59, та які були модифіковані у каркасних областях таким чином, щоб вони включали одну або декілька послідовностей-оптимізуючих замінів, переважно, одну або декілька замінів, зазначених у таблиці 24 для нанотіла 163E3, та у таблиці 26 для нанотіла 127D1. Нанотіло 163E3, переважно, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:217, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:217, а нанотіло 127D1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:216, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:216. Наприклад, каркасні області цих нанотіл можуть мати послідовність каркасних областей FR1, FR2, FR3 або FR4, пронумерованих за Kabat, та представлених у будь-якій з SEQ ID NO:213-219 у таблиці 32. Переважно, таке біпаратопне нанотіло з оптимізованою послідовністю може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

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

Цей варіант здійснення винаходу відноситься до біпаратопного нанотіла, де зазначене друге нанотіло включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:146, 166 і 186, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:146, 166 та 186, і де зазначене перше нанотіло включає щонайменше одну CDR, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:151, 171 і 191, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:151, 171 або 191.

Біпаратопне нанотіло, переважно, має структуру:

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

де у зазначеному другому нанотілі, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:146, CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:166, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:186; і де у зазначеному першому нанотілі, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:151, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:171, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:191 або де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, щонайменше на 85% або щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні будь-якій одній з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:146, 166, 186, 151, 171 або 191.

Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких послідовностей з SEQ ID NO:146, 166, 186, 151, 171, 191, тільки консервативними амінокислотними замінами. Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких зазначених вище послідовностей



ID тільки однією, двома або трьома амінокислотами.

Відповідно до цього аспекту винаходу FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:84, FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:105, FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:125, FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131, FR5

містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:89, FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:110, FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:130 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

У альтернативному варіанті, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 і FR8 мають амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або

щонайменше на 95% ідентичні будь-яким амінокислотним послідовностям з SEQ ID NO:84, 105, 125, 131, 89, 110 або 130.

Наприклад, у цьому аспекті винаходу, FR1 та/або FR4 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:70-89; FR2 та/або FR5 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:91-110; FR3 та/або FR6

можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:111-130 та FR4 та/або FR8 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:131-133.

У кращому варіанті здійснення винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:62, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:62.

У одному із кращих варіантів здійснення винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:62; або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична послідовності SEQ ID NO:62 або щонайменше на 80% ідентична каркасним областям, пронумерованим за Kabat, де зазначене біпаратопне нанотіло може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

У іншому кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу, біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить, в основному, послідовності CDR, які представлені в SEQ ID NO:62, та які були модифіковані у каркасних областях таким чином, щоб вони включали одну або декілька послідовностей-оптимізуючих замінів, переважно, одну або кілька замінів, зазначених у таблиці 24 для нанотіла 163E3, та в таблиці 30 для нанотіла 51B12. Нанотіло 163E3, переважно, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:217, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:217, а нанотіло 51B12 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:219 або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:219. Наприклад, каркасні області цих нанотіл можуть мати послідовності каркасних областей FR1, FR2, FR3 або FR4, пронумерованих за Kabat та представлених у будь-якій з SEQ ID NO:212-219 у таблиці 32. Переважно, таке біпаратопне нанотіло з оптимізованою послідовністю може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

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

Цей варіант здійснення винаходу відноситься до біпаратопного нанотіла, де зазначене друге нанотіло включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:145, 165 і 185, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:145, 165 і 185, та де зазначене перше нанотіло включає щонайменше одну CDR, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:151, 171 і 191, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:151, 171 або 191.

Біпаратопне нанотіло, переважно, має структуру:

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

де у зазначеному першому нанотілі, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:145, CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:165, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:185, та де у зазначеному другому нанотілі, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:151, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:171, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:191 або де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90%, або щонайменше на 95% ідентичні будь-якій одній з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:145, 165, 185, 151, 171 або 191.

Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-якої з послідовностей SEQ ID

NO:145, 165, 185, 151, 171 або 191, тільки консервативними амінокислотними замінами. Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких зазначених вище послідовностей ID тільки однією, двома або трьома амінокислотами.

Відповідно до цього аспекту винаходу, FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:83, FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:104, FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:124, FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131, FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:89, FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:110, FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:130 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

У альтернативному варіанті, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 можуть мати амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:83, 104, 124, 131, 89, 110 або 130.

Наприклад, у цьому аспекті винаходу, FR1 та/або FR4 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:70-89; FR2 та/або FR5 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:91-110; FR3 та/або FR6 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:111-130, і FR4 та/або FR8 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:131-133.

У кращому варіанті здійснення винаходу біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:63, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:63.

У одному із кращих варіантів винаходу, біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:63, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична послідовності SEQ ID NO:63, або щонайменше на 80% ідентична каркасним областям, пронумерованим за Kabat, де зазначене біпаратопне нанотіло може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 2,0-9 M.

У іншому кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить, в основному, послідовності CDR SEQ ID NO:63, і які були модифіковані у каркасних областях таким чином, щоб вони включали одну або декілька послідовностей-оптимізуючих заміни, переважно, одну або кілька заміни, зазначених у таблиці 28 для нанотіла 163D2, та у таблиці 30 для нанотіла 54B12. Нанотіло 163D2, переважно, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:218, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:218, а нанотіло 54B12 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:219, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:219. Так, наприклад, каркасні області цих нанотіл можуть мати послідовність каркасних областей FR1, FR2, FR3 або FR4, пронумерованих за Kabat та представлених у будь-якій з SEQ ID NO:213-219 у таблиці 32. Переважно, таке біпаратопне нанотіло з оптимізованою послідовністю може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

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

Цей варіант здійснення винаходу відноситься до біпаратопного нанотіла, де зазначене перше нанотіло включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:147, 167 і 187, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:147, 167 і 187, та де зазначене друге нанотіло включає щонайменше одну CDR, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:146, 166 та 186, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:146, 166 або 186.

Біпаратопне нанотіло, переважно, має структуру:

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

де у зазначеному першому нанотілі, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:147, CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:167, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:187, та де у зазначеному другому нанотілі, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:146, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:166, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:186, або де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні будь-якій одній з

амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:147, 167, 187, 164, 146 або 186.

Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від послідовностей, представлених у будь-якій з SEQ ID NO:147, 167, 187, 146, 166 або 186, тільки консервативними амінокислотними замінами. Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких зазначених вище послідовностей ID тільки однією, двома або трьома амінокислотами.

Відповідно до цього аспекту винаходу, FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:85, FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:106, FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:126, FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131, FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:84, FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:105, FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:125 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

У альтернативному варіанті, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 мають амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:85, 106, 126, 131, 84, 105 або 125.

Наприклад, у цьому аспекті винаходу, FR1 та/або FR4 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:70-89; FR2 та/або FR5 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:91-110; FR3 та/або FR6 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:111-130, та FR4 та/або FR8 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:131-133.

У кращому варіанті здійснення винаходу біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:64, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:64.

У одному із кращих варіантів винаходу, біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:64, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична послідовності SEQ ID NO:64, або щонайменше на 80% ідентична каркасним областям, пронумерованим за Kabat, де зазначене біпаратопне нанотіло може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 нМ.

У іншому кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу, біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить, в основному, послідовності CDR, які представлені в SEQ ID NO:64, та які були модифіковані у каркасних областях таким чином, щоб вони включали одну або декілька послідовностей-оптимізуючих замінів, переважно, одну або кілька замінів, зазначених у таблиці 20 для нанотіла 2B2, та у таблиці 24 для нанотіла 163E2. Нанотіло 2B2, переважно, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:213 або 214, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:213 або 214, а нанотіло 163E2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:217, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:217. Так, наприклад, каркасні області цих нанотіл можуть мати послідовність каркасних областей FR1, FR2, FR3 або FR4, пронумерованих за Kabat та представлених у будь-якій з SEQ ID NO:213-219 у таблиці 32. Переважно, таке біпаратопне нанотіло з оптимізованою послідовністю може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 нМ.

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

Цей варіант здійснення винаходу відноситься до біпаратопного нанотіла, де зазначене перше нанотіло включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO: 147, 167 та 187, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:147, 167 або 187, та де зазначене друге нанотіло включає щонайменше одну CDR, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:145, 165 та 185, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:145, 165 або 185.

Біпаратопне нанотіло, переважно, має структуру:

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

де у зазначеному першому нанотілі, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:147, CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:167, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:187, та де у зазначеному другому нанотілі, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:145, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:165, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:185, або де

амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, щонайменше на 85% або щонайменше на 90%, або щонайменше на 95% ідентичні будь-якій одній з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:147, 167, 187, 145, 165 або 185.

5 Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від послідовностей SEQ ID NO:147, 167, 187, 145, 165 або 185, тільки консервативними амінокислотними замінами. Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких зазначених вище послідовностей ID тільки однією, двома або трьома амінокислотами.

Відповідно до цього аспекту винаходу FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:85, FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:106, FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:126, FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131, FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:83, FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:104, FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:124 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

15 У альтернативному варіанті, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 можуть мати амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:85, 106, 126, 131, 83, 104 або 124.

20 Так, наприклад, у цьому аспекті винаходу, FR1 та/або FR4 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:70-89; FR2 та/або FR5 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:91-110; FR3 та/або FR6 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:111-130, та FR4 та/або FR8 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:131-133.

25 Краще біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:65, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:65.

30 У одному із кращих варіантів здійснення винаходу, біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:65, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична послідовності SEQ ID NO:65, або щонайменше на 80% ідентична каркасним областям, пронумерованим за Kabat, де зазначене біпаратопне нанотіло може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 нМ.

35 У іншому кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить, в основному, послідовності CDR SEQ ID NO:65, та які були модифіковані у каркасних областях таким чином, щоб вони включали одну або декілька послідовностей-оптимізуючих замінів, переважно, одну або кілька замінів, зазначених у таблиці 20 для нанотіла 2B2, та у таблиці 28 для нанотіла 163D2. Нанотіло 2B2, переважно, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:213 або 214, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:213 або 214, а нанотіло 163D2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:218, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:218. Так, наприклад, каркасні області цих нанотіл можуть мати послідовність каркасних областей FR1, FR2, FR3 або FR4, пронумерованих за Kabat та представлених у будь-якій з SEQ ID NO:213-219 у таблиці 32. Переважно, таке біпаратопне нанотіло з оптимізованою послідовністю може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 нМ.

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

50 Цей варіант здійснення винаходу відноситься до біпаратопного нанотіла, де зазначене друге нанотіло включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:143, 163 та 183, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:143, 163 або 183, та де зазначене перше нанотіло включає щонайменше одну CDR, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:147, 167 та 187, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:147, 167 або 187.

Біпаратопне нанотіло, переважно, має структуру:

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

60 де у зазначеному другому нанотілі, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:143; CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:163, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:183, та де у зазначеному першому нанотілі, CDR4

містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:147; CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:167, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:187, або де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні будь-якій одній з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:143, 163, 183, 147, 167 або 187.

Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від послідовностей, представлених у будь-якій з SEQ ID NO:143, 163, 183, 147, 167 або 187, тільки консервативними амінокислотними замінами. Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких зазначених вище послідовностей ID тільки однією, двома або трьома амінокислотами.

Відповідно до цього аспекту винаходу, FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:81, FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:102, FR3 містить амінокислотну послідовність в SEQ ID NO:122, FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:133, FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:85, FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:106, FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:126 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

У альтернативному варіанті, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 мають амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:81, 102, 122, 133, 85, 106, 126 або 131.

Так, наприклад, у цьому аспекті винаходу, FR1 та/або FR4 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:70-89; FR2 та/або FR5 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:91-110; FR3 та/або FR6 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:111-130, та FR4 та/або FR8 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:131-133.

Краще біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:47, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:47.

У особливо кращому варіанті здійснення винаходу біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:47, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична послідовності SEQ ID NO:47 або щонайменше на 80% ідентична каркасним областям, пронумерованим за Kabat, де зазначене біпаратопне нанотіло може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

У іншому кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить, в основному, послідовності CDR, які представлені в SEQ ID NO:47, та які були модифіковані у каркасних областях таким чином, щоб вони включали одну або декілька послідовностей-оптимізуючих замінів, переважно, одну або кілька замінів, зазначених у таблиці 22 для нанотіла 97A9, та у таблиці 20 для нанотіла 2B2. Нанотіло 97A9, переважно, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:215, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:215, а нанотіло 2B2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:213 або 214, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:213 або 214. Так, наприклад, каркасні області цих нанотіл можуть мати послідовність каркасних областей FR1, FR2, FR3 або FR4, пронумерованих за Kabat та представлених у будь-якій з SEQ ID NO:213-219 у таблиці 32. Переважно, таке біпаратопне нанотіло з оптимізованою послідовністю може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

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

Цей варіант здійснення винаходу відноситься до біпаратопного нанотіла, де зазначене друге нанотіло включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:143, 163 і 183, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:143, 163 або 183, та де зазначене перше нанотіло включає щонайменше одну CDR, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:151, 171 і 191, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:151, 171 або 191.

Біпаратопне нанотіло, переважно, має структуру:

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

де у зазначеному другому нанотілі, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID

NO:143; CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:163, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:183, та де у зазначеному першому нанотілі, CDR4 містить амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO:151, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:171, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:191, або де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, або щонайменше на 90%, або щонайменше на 95% ідентичні будь-якій одній з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:143, 163, 183, 151, 171 або 191.

Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від послідовностей, представлених у будь-якій з SEQ ID NO:143, 163, 183, 151, 271 або 191, тільки консервативними амінокислотними замінами. Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких зазначених вище послідовностей ID тільки однією, двома або трьома амінокислотами.

Відповідно до цього аспекту винаходу, FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:81; FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:102; FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:122; FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:133; FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:89; FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:110; FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:130; та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

У альтернативному варіанті, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 і FR8 мають амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:81, 102, 122, 133, 89, 110, 130 або 131.

Так, наприклад, у цьому аспекті винаходу, FR1 та/або FR4 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:70-89; FR2 та/або FR5 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:91-110; FR3 та/або FR6 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:111-130 та FR4 та/або FR8 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:131-133.

У кращому варіанті здійснення винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:61, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:61.

У особливо кращому варіанті здійснення винаходу біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:61, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична послідовності SEQ ID NO:61 або щонайменше на 80% ідентична каркасним областям, пронумерованим за Kabat, де зазначене біпаратопне нанотіло може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

У іншому кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить, в основному, послідовності CDR, які представлені в SEQ ID NO:61, та які були модифіковані у каркасних областях таким чином, щоб вони включали одну або декілька послідовностей-оптимізуючих замінів, переважно, одну або кілька замінів, зазначених у таблиці 22 для нанотіла 97A9, та у таблиці 30 для нанотіла 54B12. Нанотіло 97A9, переважно, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:215, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:215, а нанотіло 54B12 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:219, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:219. Так, наприклад, каркасні області цих нанотіл можуть мати послідовності каркасних областей FR1, FR2, FR3 або FR4, пронумерованих за Kabat та представлених у будь-якій з SEQ ID NO:213-219 у таблиці 32. Переважно, таке біпаратопне нанотіло з оптимізованою послідовністю може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

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

Цей варіант здійснення винаходу відноситься до біпаратопного нанотіла, де зазначене перше нанотіло, визначене вище, включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:141, 161 і 181, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:141, 161 або 181, та де зазначене друге нанотіло включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:145, 165 та 185, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним

послідовностям SEQ ID NO:145, 165 або 185.

Біпаратопне нанотіло, переважно, має структуру:

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

де у зазначеному першому нанотілі, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:141; CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:161; а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:181, і де у зазначеному другому нанотілі, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:145; CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:165; а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:185, або де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні будь-якій одній з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:141, 161, 181, 145, 165 або 185.

Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-якої з послідовностей SEQ ID NO:145, 165, 185, 141, 161 або 181, тільки консервативними амінокислотними замінами. Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких зазначених вище послідовностей ID тільки однією, двома або трьома амінокислотами.

У кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:79; FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:100; FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:120, FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131; FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:83; FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:104, FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:124; та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

У альтернативному варіанті, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 можуть мати амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:79, 100, 120, 131, 83, 104 або 124.

Так, наприклад, у цьому аспекті винаходу, FR1 та/або FR4 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:70-89; FR2 та/або FR5 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:91-110; FR3 та/або FR6 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:111-130, та FR4 та/або FR8 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:131-133.

У особливо кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:53, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:53.

У іншому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:53, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична послідовності SEQ ID NO:53, або щонайменше на 80% ідентична каркасним областям, пронумерованим за Kabat, де зазначене біпаратопне нанотіло може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC<sub>50</sub> менше, ніж 20 nM.

У іншому кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить, в основному, послідовності CDR, які представлені у SEQ ID NO:54, та які були модифіковані у каркасних областях таким чином, щоб вони включали одну або декілька послідовностей-оптимізуючих заміни, переважно, одну або кілька заміни, зазначених у таблиці 26 для нанотіла 127D1, та у таблиці 28 для нанотіла 163D2. Нанотіло 127D1, переважно, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:216, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:216, а нанотіло 163D2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:218, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:218. Так, наприклад, каркасні області цих нанотіл можуть мати послідовність каркасних областей FR1, FR2, FR3 або FR4, пронумерованих за Kabat та представлених у будь-якій з SEQ ID NO:213-219 у таблиці 32. Переважно, таке біпаратопне нанотіло з оптимізованою послідовністю може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC<sub>50</sub> менше, ніж 20 nM.

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

Цей варіант здійснення винаходу відноситься до біпаратопного нанотіла, де зазначене перше нанотіло, визначене вище, включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:141, 161 і 181, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID

NO:141, 161 або 181, та де зазначене друге нанотіло включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:146, 166 та 186, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:146, 166 або 186.

5 Біпаратопне нанотіло, переважно, має структуру:

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

де у зазначеному першому нанотілі, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:141, CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:161, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:181, та де у зазначеному другому нанотілі, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:146, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:166, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:186, або де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні будь-якій одній з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:146, 166, 186, 141, 161 або 181.

15 Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від послідовностей, представлених у будь-якій з SEQ ID NO:146, 166, 186, 141, 161 або 181, тільки консервативними амінокислотними замінами. Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких зазначених вище послідовностей ID тільки однією, двома або трьома амінокислотами.

У кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:79, FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:100, FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:120, FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131, FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:84, FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:105, FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:125 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

25 У альтернативному варіанті, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 можуть мати амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:79, 100, 120, 131, 84, 105 або 125.

30 Так, наприклад, у цьому аспекті винаходу, FR1 та/або FR4 можуть містити будь-які амінокислотні послідовності з SEQ ID NO:70-89; FR2 та/або FR5 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:91-110; FR3 та/або FR6 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:111-130, і FR4 та/або FR8 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:131-133.

35 У особливо кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:54, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:54.

40 У іншому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:54, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична послідовності SEQ ID NO:54, або щонайменше на 80% ідентична каркасним областям, пронумерованим за Kabat, де зазначене біпаратопне нанотіло може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

45 У іншому кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить, в основному, послідовності CDR, які представлені в SEQ ID NO:54, та які були модифіковані у каркасних областях таким чином, щоб вони включали одну або декілька послідовностей-оптимізуючих замінів, переважно, одну або кілька замінів, зазначених у таблиці 26 для нанотіла 127D1, та у таблиці 24 для нанотіла 163E3. Нанотіло 127D1, переважно, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:216, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:216, а нанотіло 163E3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:217, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:217. Так, наприклад, каркасні області цих нанотіл можуть мати послідовність каркасних областей FR1, FR2, FR3 або FR4, пронумерованих за Kabat та представлених у будь-якій з SEQ ID NO:213-219 у таблиці 32. Переважно, таке біпаратопне нанотіло з оптимізованою послідовністю може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

11) 127D1/97A9 (SEQ ID NO:37 та 39)

60 Цей варіант здійснення винаходу відноситься до біпаратопного нанотіла, де зазначене перше нанотіло, визначене вище, включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну



послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:141, 161 та 181, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:141, 161 або 181, та де зазначене друге нанотіло включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:143, 163 та 183, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:143, 163 або 183.

Біпаратопне нанотіло, переважно, має структуру:

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

де у зазначеному першому нанотілі, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:141, CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:161, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:181, та де у зазначеному другому нанотілі, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:143, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:163, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:183, або де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, щонайменше на 85% щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні будь-якій одній з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:141, 161, 181, 143, 163 або 183.

Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від послідовностей, представлених у будь-якій з SEQ ID NO:141, 161, 181, 143, 163 або 183, тільки консервативними амінокислотними замінами. Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких зазначених вище послідовностей ID тільки однією, двома або трьома амінокислотами.

У кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:79, FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:100, FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:120, FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131, FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:81, FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:102, FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:122 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:133.

У альтернативному варіанті, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 можуть мати амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:79, 100, 120, 131, 81, 102, 122 або 133.

Наприклад, у цьому аспекті винаходу, FR1 та/або FR4 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:70-89; FR2 та/або FR5 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:91-110; FR3 та/або FR6 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:111-130, та FR4 та/або FR8 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:131-133.

У особливо кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить перший антигензв'язуючий домен, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37, та другий антигензв'язуючий домен, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:39, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:37 та 39.

У іншому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37 та 39, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична послідовності SEQ ID NO:37 та 39, або щонайменше на 80% ідентична каркасним областям, пронумерованим за Kabat, де зазначений біпаратопний поліпептид може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC<sub>50</sub> менше, ніж 20 nM.

У іншому кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить, в основному, послідовності CDR, які представлені в SEQ ID NO:37 та 39, та які були модифіковані у каркасних областях таким чином, щоб вони включали одну або декілька послідовностей-оптимізуючих замінів, переважно, одну або кілька замінів, зазначених у таблиці 26 для нанотіла 127D1, та у таблиці 22 для нанотіла 97A9. Нанотіло 127D1, переважно, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:216, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:216, а нанотіло 97A9 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:215, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:215. Так, наприклад, каркасні області цих нанотіл можуть мати послідовність каркасних областей FR1, FR2, FR3 або FR4, пронумерованих за Kabat та представлених у будь-якій з SEQ ID NO:213-219 у таблиці 32.

Переважно, таке біпаратопне нанотіло з оптимізованою послідовністю може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

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

Цей варіант здійснення винаходу відноситься до біпаратопного нанотіла, де зазначене перше нанотіло, визначене вище, включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:147, 167 та 187, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:147, 167 або 187, та де зазначене друге нанотіло включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:143, 163 та 183, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:143, 163 або 183.

Біпаратопне нанотіло, переважно, має структуру:

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

де у зазначеному першому нанотілі, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:147, CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:167, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:187, та де у зазначеному другому нанотілі, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:143, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:163, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:183, або де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні будь-якій одній з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:147, 167, 187, 143, 163 або 183.

Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від послідовностей, представлених у будь-якій з SEQ ID NO:147, 167, 187, 143, 163 або 183, тільки консервативними амінокислотними замінами. Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких зазначених вище послідовностей ID тільки однією, двома або трьома амінокислотами.

У кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:85, FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:106, FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:126, FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131, FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:81, FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:102, FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:122 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:133.

У альтернативному варіанті FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 можуть мати амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:85, 106, 126, 131, 81, 102, 122 або 133.

Так, наприклад, у цьому аспекті винаходу, FR1 та/або FR4 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:70-89, FR2 та/або FR5 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:91-110; FR3 та/або FR6 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:111-130, та FR4 та/або FR8 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:131-133.

У особливо кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:46, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:46.

У іншому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:46, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична послідовності SEQ ID NO:46, або щонайменше на 80% ідентична каркасним областям, пронумерованим за Kabat, де зазначене біпаратопне нанотіло може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

У іншому кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить, в основному, послідовності CDR, які представлені в SEQ ID NO:46, та які були модифіковані у каркасних областях таким чином, щоб вони включали одну або декілька послідовностей-оптимізуючих замінів, переважно, одну або кілька замінів, зазначених у таблиці 20 для нанотіла 2B2, та у таблиці 22 для нанотіла 97A9. Нанотіло 2B2, переважно, містить амінокислотну послідовність, SEQ ID NO:213 або 214, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:213 або 214, а нанотіло 97A9 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:215, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична

амінокислотній послідовності SEQ ID NO:215. Так, наприклад, каркасні області цих нанотіл можуть мати послідовність каркасних областей FR1, FR2, FR3 або FR4, пронумерованих за Kabat та представлених у будь-якій з SEQ ID NO:213-219 у таблиці 32. Переважно, таке біпаратопне нанотіло з оптимізованою послідовністю може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 нМ.

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

Цей варіант здійснення винаходу відноситься до біпаратопного нанотіла, де зазначене перше нанотіло, визначене вище, включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:151, 171 та 191, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:151, 171 або 191, та де зазначене друге нанотіло включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:145, 165 та 185, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:145, 165 або 185.

Біпаратопне нанотіло, переважно, має структуру:

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

де у зазначеному першому нанотілі, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:151, CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:171, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:191, та де у зазначеному другому нанотілі, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:145, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:165, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:185, або де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні будь-якій одній з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:151, 171, 191, 145, 165 або 185.

Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від послідовностей, представлених у будь-якій з SEQ ID NO:151, 171, 191, 145, 165 або 185, тільки консервативними амінокислотними замінами. Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких зазначених вище послідовностей ID тільки однією, двома або трьома амінокислотами.

У кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:89, FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:110, FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:130, FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131, FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:83, FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:104, FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:124 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

У альтернативному варіанті, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 можуть мати амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:89, 110, 130, 131, 83, 104 або 124.

Наприклад, у цьому аспекті винаходу, FR1 та/або FR4 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:70-89; FR2 та/або FR5 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:91-110; FR3 та/або FR6 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:111-130, і FR4 та/або FR8 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:131-133.

У особливо кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:69, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:69.

У іншому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:69, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична послідовності SEQ ID NO:69, або щонайменше на 80% ідентична каркасним областям, пронумерованим за Kabat, де зазначене біпаратопне нанотіло може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 нМ.

У іншому кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить, в основному, послідовності CDR, які представлені у SEQ ID NO:69, та які були модифіковані у каркасних областях таким чином, щоб вони включали одну або декілька послідовностей-оптимізуючих замінів, переважно, одну або кілька замінів, зазначених у таблиці 30 для нанотіла 54B12, та у таблиці 28 для нанотіла 163D2. Нанотіло 54B12, переважно, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:219, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або

щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:219, а нанотіло 163D2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:218, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:218. Наприклад, каркасні області цих нанотіл можуть мати послідовність каркасних областей FR1, FR2, FR3 або FR4, пронумерованих за Kabat та представлених у будь-якій з SEQ ID NO:213-219 у таблиці 32. Переважно, таке біпаратопне нанотіло з оптимізованою послідовністю може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

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

Цей варіант здійснення винаходу відноситься до біпаратопного нанотіла, де зазначене перше нанотіло, визначене вище, включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:151, 171 та 191, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:151, 171 або 191, та де зазначене друге нанотіло включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:146, 166 та 186, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:146, 166 або 186.

Біпаратопне нанотіло, переважно, має структуру:

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

де у зазначеному першому нанотілі, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:151, CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:171, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:191, та де у зазначеному другому нанотілі, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:146, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:166, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:186, або де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні будь-якій одній з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:151, 171, 191, 146, 166 або 186.

Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від послідовностей, представлених у будь-якій з SEQ ID NO:151, 171, 191, 146, 166 або 186, тільки консервативними амінокислотними замінами. Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких зазначених вище послідовностей ID тільки однією, двома або трьома амінокислотами.

У кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:89, FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:110, FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:130, FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131, FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:84, FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:105, FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:125 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

У альтернативному варіанті, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 можуть мати амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:89, 110, 130, 131, 84, 105 або 125.

Наприклад, у цьому аспекті винаходу, FR1 та/або FR4 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:70-89; FR2 та/або FR5 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:91-110; FR3 та/або FR6 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:111-130, і FR4 та/або FR8 можуть містити будь-які амінокислотні послідовності з SEQ ID NO:131-133.

У особливо кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:68, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:68.

У іншому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:68, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична послідовності SEQ ID NO:68, або щонайменше на 80% ідентична каркасним областям, пронумерованим за Kabat, де зазначене біпаратопне нанотіло може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

У іншому кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить, в основному, послідовності CDR, які представлені у SEQ ID NO:68, та які були модифіковані у каркасних областях таким чином, щоб вони включали одну або декілька послідовностей-оптимізованих замінів, переважно, одну або кілька замінів, зазначених у таблиці 30 для нанотіла 54B12, та у таблиці 24 для нанотіла 163E3. Нанотіло 54B12,

переважно, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:219, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:219, а нанотіло 163E3 містить амінокислотну послідовність, SEQ ID NO:217, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:217. Так, наприклад, каркасні області цих нанотіл можуть мати послідовність каркасних областей FR1, FR2, FR3 або FR4, пронумерованих за Kabat та представлених у будь-якій з SEQ ID NO:213-219 у таблиці 32. Переважно, таке біпаратопне нанотіло з оптимізованою послідовністю може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

15) 54B12/97A9 (SEQ ID NO:90 та 39)

Цей варіант здійснення винаходу відноситься до біпаратопного нанотіла, де зазначене перше нанотіло, визначене вище, включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:141, 161 та 181, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:141, 161 або 181, та де зазначене друге нанотіло включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:143, 163 і 183, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:143, 163 або 183.

Біпаратопне нанотіло, переважно, має структуру:

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

де у зазначеному першому нанотілі, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:141, CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:161, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:181, та де у зазначеному другому нанотілі, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:143, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:163, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:183, або де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні будь-якій одній з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:141, 161, 181, 143, 163 або 183.

Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від послідовностей, представлених у будь-якій з SEQ ID NO:141, 161, 181, 143, 163 або 183, тільки консервативними амінокислотними замінами. Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких зазначених вище послідовностей ID тільки однією, двома або трьома амінокислотами.

У кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:89, FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:110, FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:130, FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131, FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:81, FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:102, FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:122 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

У альтернативному варіанті FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 можуть мати амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:89, 110, 130, 131, 81, 102 або 122.

Наприклад, у цьому аспекті винаходу FR1 та/або FR4 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:70-89; FR2 та/або FR5 можуть містити будь-які амінокислотні послідовності з SEQ ID NO:91-110; FR3 та/або FR6 можуть містити будь-які амінокислотні послідовності з SEQ ID NO:111-130, та FR4 та/або FR8 можуть містити будь-які амінокислотні послідовності з SEQ ID NO:131-133.

У особливо кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотні послідовності у SEQ ID NO:90 та 39, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:90 та 39.

У іншому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:90 та 39, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична послідовності SEQ ID NO:90 і 39, або щонайменше на 80% ідентична каркасним областям, пронумерованим за Kabat, де зазначене біпаратопне нанотіло може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

У іншому кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить, в основному, послідовності CDR, які представлені у SEQ ID NO:90 та 39, та які були модифіковані у каркасних областях таким чином, щоб вони включали

одну або декілька послідовність-оптимізуючих заміни, переважно, одну або кілька заміни, зазначених у таблиці 30 для нанотіла 54B12, та у таблиці 22 для нанотіла 97A9. Нанотіло 54B12, переважно, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:90 та 39, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або  
 5 щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:90 та/або 39, а нанотіло 97A9 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:215, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:215. Так, наприклад, каркасні області цих нанотіл можуть мати послідовність каркасних областей FR1, FR2, FR3 або  
 10 FR4, пронумерованих за Kabat та представлених у будь-якій з SEQ ID NO:213-219 у таблиці 32. Переважно, таке біпаратопне нанотіло з оптимізованою послідовністю може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

16) 97A9/127D1 (SEQ ID NO:39 та 37)

Цей варіант здійснення винаходу відноситься до біпаратопного нанотіла, де зазначене  
 15 друге нанотіло, визначене вище, включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:143, 163 та 183, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:143, 163 або 183, та де зазначене перше нанотіло включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що  
 20 складається з SEQ ID NO:141, 161 та 181, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:141, 161 або 181.

Біпаратопне нанотіло, переважно, має структуру:

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

де у зазначеному другому нанотілі, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID  
 25 NO:143, CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:163, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:183, і де у зазначеному першому нанотілі, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:141, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:161, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:181, або де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%,  
 30 щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні будь-якій одній з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:143, 163, 183, 141, 161 або 181.

Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від послідовностей, представлених у будь-якій з SEQ ID NO:143, 163, 183, 141, 161 або 181, тільки консервативними амінокислотними замінами. Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких зазначених вище  
 35 послідовностей ID тільки однією, двома або трьома амінокислотами.

У кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:81, FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:102, FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:122, FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:133, FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:79, FR6 містить  
 40 амінокислотну послідовність SEQ ID NO:100, FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:120 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

У альтернативному варіанті, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 можуть мати амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у  
 45 будь-якій з SEQ ID NO:81, 102, 122, 133, 79, 100, 120 або 131.

Наприклад, у цьому аспекті винаходу, FR1 та/або FR4 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:70-89, FR2 та/або FR5 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:91-110, FR3 та/або FR6 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:111-130, і  
 50 FR4 та/або FR8 можуть містити будь-які амінокислотні послідовності з SEQ ID NO:131-133.

У особливо кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність із SEQ ID NO:39 та 37, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:39 та/або 37.

У іншому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність із SEQ ID NO:39 та 37, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична послідовності SEQ ID NO:39 та/або 37, або щонайменше на 80% ідентична каркасним областям, пронумерованим за Kabat, де зазначене біпаратопне нанотіло може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

60 У іншому кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло

відповідно до винаходу містить, в основному, послідовності CDR, які представлені у SEQ ID NO:39 та 37, та які були модифіковані у каркасних областях таким чином, щоб вони включали одну або декілька послідовностей-оптимізуючих замінів, переважно, одну або декілька замінів, зазначених у таблиці 22 для нанотіла 97A9, та у таблиці 26 для нанотіла 97A9. Нанотіло 97A9, переважно, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:39 і 37, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:39 та 37, а нанотіло 127D1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:216, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:216. Так, наприклад, каркасні області цих нанотіл можуть мати послідовність каркасних областей FR1, FR2, FR3 або FR4, пронумерованих за Kabat та представлених у будь-якій з SEQ ID NO:213-219 у таблиці 32. Переважно, таке біпаратопне нанотіло з оптимізованою послідовністю може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

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

Цей варіант здійснення винаходу відноситься до біпаратопного нанотіла, де зазначене друге нанотіло, визначене вище, включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:145, 165 та 185, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:145, 165 або 185, та де зазначене перше нанотіло включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:147, 167 та 187, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:147, 167 або 187.

Біпаратопне нанотіло, переважно, має структуру:

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

де у зазначеному другому нанотілі, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:145; CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:165, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:185, і де у зазначеному першому нанотілі, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:147, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:167, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:187, або де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні будь-якій одній з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:145, 165, 185, 147, 167 або 187.

Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких послідовностей з SEQ ID NO:145, 165, 185, 147, 167 або 187, тільки консервативними амінокислотними замінами. Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких зазначених вище послідовностей ID тільки однією, двома або трьома амінокислотами.

У кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:83, FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:104, FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:124, FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131, FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:85, FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:106, FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:126 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

У альтернативному варіанті, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 можуть мати амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:83, 104, 124, 131, 85, 106 або 126.

Наприклад, у цьому аспекті винаходу, FR1 та/або FR4 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:70-89; FR2 та/або FR5 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:91-110; FR3 та/або FR6 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:111-130, та FR4 та/або FR8 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:131-133.

У особливо кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:67, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:67.

У іншому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:67, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична послідовності SEQ ID NO:67, або щонайменше на 80% ідентична каркасним

областям, пронумерованим за Kabat, де зазначене біпаратопне нанотіло може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 нМ.

У іншому кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить, в основному, послідовності CDR, які представлені в SEQ ID NO:67, та які були модифіковані у каркасних областях таким чином, щоб вони включали одну або декілька послідовностей-оптимізуючих замінів, переважно, одну або кілька замінів, зазначених у таблиці 28 для нанотіла 163D2, та у таблиці 20 для нанотіла 2B2. Нанотіло 163D2, переважно, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:218, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:218, а нанотіло 2B2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:213 або 214, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:213 або 214. Так, наприклад, каркасні області цих нанотіл можуть мати послідовність каркасних областей FR1, FR2, FR3 або FR4, пронумерованих за Kabat та представлених у будь-якій з SEQ ID NO:213-219 у таблиці 32. Переважно, таке біпаратопне нанотіло з оптимізованою послідовністю може інгібувати зв'язування GRO $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 нМ.

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

Цей варіант здійснення винаходу відноситься до біпаратопного нанотіла, де зазначене друге нанотіло, визначене вище, включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:146, 166 і 186, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:146, 166 або 186, та де зазначене перше нанотіло включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:147, 167 та 187, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:147, 167 або 187.

Біпаратопне нанотіло, переважно, має структуру:

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

де у зазначеному другому нанотілі, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:146, CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:166, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:186, та де у зазначеному першому нанотілі, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:147, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:167, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:187 або де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні будь-якій одній з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:146, 166, 186, 147, 167 або 187.

Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від послідовностей, представлених у будь-якій з SEQ ID NO:146, 166, 186, 147, 167 або 187, тільки консервативними амінокислотними замінами. Амінокислотні послідовності можуть відрізнятися від будь-яких зазначених вище послідовностей ID тільки однією, двома або трьома амінокислотами.

У кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:84, FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:105, FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:125, FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131, FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:85, FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:106, FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:126 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

У альтернативному варіанті FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 можуть мати амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:84, 105, 125, 131, 85, 106 або 126.

Наприклад, у цьому аспекті винаходу, FR1 та/або FR4 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:70-89; FR2 та/або FR5 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:91-110; FR3 та/або FR6 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:111-130, та FR4 та/або FR8 можуть містити амінокислотні послідовності, представлені у будь-якій з SEQ ID NO:131-133.

У особливо кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:66, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:66.



У іншому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:66, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80% ідентична послідовності SEQ ID NO:66 або щонайменше на 80% ідентична каркасним областям, пронумерованим за Kabat, де зазначене біпаратопне нанотіло може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

У іншому кращому варіанті здійснення цього аспекту винаходу біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу містить, в основному, послідовності CDR, які представлені в SEQ ID NO:66, та які були модифіковані у каркасних областях таким чином, щоб вони включали одну або декілька послідовностей-оптимізуючих замінів, переважно, одну або кілька замінів, зазначених у таблиці 24 для нанотіла 163E3, і в таблиці 20 для нанотіла 2B2. Нанотіло 163E3, переважно, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:217, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:217, а нанотіло 2B2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:213 або 214, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:213 або 214. Так, наприклад, каркасні області цих нанотіл можуть мати послідовність каркасних областей FR1, FR2, FR3 або FR4, пронумерованих за Kabat та представлених у будь-якій з SEQ ID NO:213-219 у таблиці 32. Переважно, таке біпаратопне нанотіло з оптимізованою послідовністю може інгібувати зв'язування GRO- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 nM.

Як уже обговорювалося вище, якщо кращі біпаратопні нанотіла відповідно до винаходу, включаючи їх конкретні варіанти та модифікації, позначені 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 або 163E3/2B2, мають у своїх каркасних областях щонайменше одну послідовність-оптимізуючу амінокислотну заміну, тоді бажано, щоб зазначені каркасні області були, наприклад, частково або повністю гуманізованими. Бажано, щоб ступінь оптимізації послідовності дозволяв одержати біпаратопне нанотіло, що має амінокислотну послідовність, яка була б на 80-90% ідентична, щонайменше у каркасних областях, послідовностям SEQ ID NO:58, 59, 62, 63, 64, 65, 47, 61, 53, 54, 46, 69, 68, 67 або 66.

Варіанти здійснення даного винаходу також включають поліпептиди, у яких перший антигензв'язуючий домен вибраний з SEQ ID NO:213, 214, 216 та 219, або поліпептиду, що має послідовність, яка щонайменше на 80%, наприклад, щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентична одній із цих послідовностей, а другий антигензв'язуючий домен вибраний з SEQ ID NO:215, 217 та 218, або поліпептиду, що має послідовність, яка щонайменше на 80%, наприклад, щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентична одній із цих послідовностей.

(0079-0076)

У одному з варіантів здійснення винаходу поліпептид, що міститься в зазначеному другому імуноглобуліні, що складається з одного варіабельного домену, містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:141, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:236, та CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:181, а поліпептид, що міститься у зазначеному першому імуноглобуліні, що складається з одного варіабельного домену, містить CDR4, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:146; CDR5, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:237, та CDR6, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:186. У інших варіантах здійснення винаходу, амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, наприклад, щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентичні будь-якій з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:141, 236, 181, 146, 237 або 186.

У іншому варіанті здійснення винаходу поліпептид містить амінокислотні послідовності, що відрізняються від послідовностей SEQ ID NO:141, 236, 181, 146, 237 або 186, тільки консервативними амінокислотними замінами.

У іншому варіанті здійснення винаходу поліпептид містить перший антигензв'язуючий домен, вибраний з SEQ ID NO:216 або поліпептиду, який щонайменше на 80%, а саме, щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентичний послідовності SEQ ID NO:216, та другий антигензв'язуючий домен, вибраний з SEQ ID NO:217 або поліпептиду, який щонайменше на 80%, а саме, щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентичний послідовності SEQ ID NO:217.

У ще одному варіанті здійснення винаходу поліпептид містить послідовність SEQ ID NO:221.

(0079-0086)

У одному з варіантів здійснення винаходу поліпептид, що міститься у зазначеному другому імуноглобуліні, що складається з одного варіабельного домену, включає CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:141, CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:236, та CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:181, а поліпептид, що міститься у зазначеному першому імуноглобуліні, що складається з одного варіабельного домену, включає CDR4, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:145, CDR5, що містить амінокислотну послідовність, SEQ ID NO:165, та CDR6, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:185. У інших варіантах здійснення винаходу, амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, наприклад, щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентичні будь-якій з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:141, 236, 181, 145, 165 або 185.

У іншому варіанті здійснення винаходу поліпептид містить амінокислотні послідовності, що відрізняються від послідовностей SEQ ID NO:141, 236, 181, 145, 165 або 185, тільки консервативними амінокислотними замінами.

У іншому варіанті здійснення винаходу поліпептид містить перший антигензв'язуючий домен, вибраний з SEQ ID NO:216 або поліпептиду, який щонайменше на 80%, а саме, щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентичний послідовності SEQ ID NO:216, та другий антигензв'язуючий домен, вибраний з SEQ ID NO:218 або поліпептиду, який щонайменше на 80%, а саме, щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентичний послідовності SEQ ID NO:218.

У ще одному варіанті здійснення винаходу поліпептид містить послідовність SEQ ID NO:222. (0079-0061)

У одному з варіантів здійснення винаходу поліпептид, що міститься у зазначеному другому імуноглобуліні, що складається з одного варіабельного домену, містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:141; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:236, та CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:181, а поліпептид, що міститься у зазначеному першому імуноглобуліні, що складається з одного варіабельного домену, містить CDR4, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:143, CDR5, що містить амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO:235, та CDR6, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:183. У інших варіантах здійснення винаходу, амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, наприклад, щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентичні будь-якій з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:141, 236, 181, 143, 235 або 183.

У іншому варіанті здійснення винаходу поліпептид містить амінокислотні послідовності, що відрізняються від послідовностей SEQ ID NO:141, 236, 181, 143, 235 або 183, тільки консервативними амінокислотними замінами.

У іншому варіанті здійснення винаходу поліпептид містить перший антигензв'язуючий домен, вибраний з SEQ ID NO:216 або поліпептиду, який щонайменше на 80%, а саме, щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентичний послідовності SEQ ID NO:216, та другий антигензв'язуючий домен, вибраний з SEQ ID NO:215 або поліпептиду, який щонайменше на 80%, а саме, щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентичний послідовності SEQ ID NO:215, де зазначені домени розділені лінкером, що мають SEQ ID NO: 220.

(0104-0076)

У одному з варіантів здійснення винаходу поліпептид, що міститься у зазначеному другому імуноглобуліні, що складається з одного варіабельного домену, включає CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:151; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:171, та CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:191, а поліпептид, що міститься у зазначеному першому імуноглобуліні, що складається з одного варіабельного домену, включає CDR4, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:146; CDR5, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:237, та CDR6, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:186. У інших варіантах здійснення винаходу, амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, наприклад, щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентичні будь-якій з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:151, 171, 191, 146, 237 або 186.

У іншому варіанті здійснення винаходу поліпептид містить амінокислотні послідовності, що відрізняються від послідовностей SEQ ID NO:151, 171, 191, 146, 237 або 186, тільки консервативними амінокислотними замінами.

У іншому варіанті здійснення винаходу поліпептид містить перший антигензв'язуючий домен, вибраний з SEQ ID NO:219 або поліпептиду, який щонайменше на 80%, а саме,

щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентичний послідовності SEQ ID NO:219, та другий антигензв'язуючий домен, вибраний з SEQ ID NO:217 або поліпептиду, який щонайменше на 80%, а саме, щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентичний послідовності SEQ ID NO:217.

5 У ще одному варіанті здійснення винаходу поліпептид містить послідовність SEQ ID NO:223. (0104-0086)

У одному з варіантів здійснення винаходу поліпептид, що міститься у зазначеному другому імуноглобуліні, що складається з одного варіабельного домену, містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:151; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:171, та CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:191, а поліпептид, що міститься у зазначеному першому імуноглобуліні, що складається з одного варіабельного домену, містить CDR4, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:145; CDR5, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:165, та CDR6, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:185. У інших варіантах здійснення винаходу, амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, наприклад, щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентичні будь-якій з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:151, 171, 191, 145, 165 або 185.

У іншому варіанті здійснення винаходу поліпептид містить амінокислотні послідовності, що відрізняються від послідовностей SEQ ID NO:151, 171, 191, 145, 165 або 185, тільки консервативними амінокислотними замінами.

У іншому варіанті здійснення винаходу поліпептид містить перший антигензв'язуючий домен, вибраний з SEQ ID NO:219 або поліпептиду, який щонайменше на 80%, а саме, щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентичний послідовності SEQ ID NO:219, та другий антигензв'язуючий домен, вибраний з SEQ ID NO:218 або поліпептиду, який щонайменше на 80%, а саме, щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентичний послідовності SEQ ID NO:218.

У ще одному варіанті здійснення винаходу поліпептид містить послідовність SEQ ID NO:224. (0104-0061)

У одному з варіантів здійснення винаходу поліпептид, що міститься у зазначеному другому імуноглобуліні, що складається з одного варіабельного домену, містить CDR1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:151; CDR2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:171, та CDR3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:191, а поліпептид, що міститься у зазначеному першому імуноглобуліні, що складається з одного варіабельного домену, містить CDR4, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:143; CDR5, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:235, та CDR6, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:183. У інших варіантах здійснення винаходу, амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80%, наприклад, щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентичні будь-якій з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:151, 171, 191, 143, 235 або 183.

40 У іншому варіанті здійснення винаходу поліпептид містить амінокислотні послідовності, що відрізняються від послідовностей SEQ ID NO:151, 171, 191, 143, 235 або 183, тільки консервативними амінокислотними замінами.

У іншому варіанті здійснення винаходу поліпептид містить перший антигензв'язуючий домен, вибраний з SEQ ID NO:219 або поліпептиду, який щонайменше на 80%, а саме, щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентичний послідовності SEQ ID NO:219, та другий антигензв'язуючий домен, вибраний з SEQ ID NO:215 або поліпептиду, який щонайменше на 80%, а саме, щонайменше на 90%, наприклад, щонайменше на 95% ідентичний послідовності SEQ ID NO:215, де зазначені домени розділені лінкером, що має SEQ ID NO: 220.

50 Що стосується вищенаведеного обговорення кращих варіантів здійснення винаходу, то в цьому зв'язку слід зазначити, що хоча це обговорення конкретно відноситься до біпаратопних нанотіл, однак, воно також відноситься і до біпаратопних поліпептидів, які спрямовані безпосередньо проти CXCR2 або зв'язуються з CXCR2, де перший та другий зв'язуючі домени містяться у стандартних чотириланцюгових антитілах, антитілах з важкими ланцюгами, у однокланцюгових Fv, Fab або Fab(2), але мають один або декілька функціональних або структурних ознак вищевказаних кращих варіантів.

Також коротко описані варіанти здійснення, у яких перший та другий антигензв'язуючі домени містяться у імуноглобуліні, що має тільки варіабельні домени, такі як  $V_L$ -домени,  $V_H$ -домени, (dAb)- та  $V_{HH}$ -домени та їх фрагменти, та які мають один або декілька функціональних або структурних ознак будь-якого з вищезгаданих варіантів здійснення.

У іншому аспекті даний винахід відноситься до поліпептидів, зокрема, до імуноглобуліну з окремими варіабельними доменами, такими як  $V_{HH}$ -домен, або до нанотіл, які є одновалентними відносно зв'язування з CXCR2, та які являють собою структурні блоки для біпаратопних поліпептидів відповідно до винаходу та можуть розглядатися як проміжні сполуки у способі їх одержання. Кращими одновалентними імуноглобулінами з окремими варіабельними доменами є поліпептиди, що мають послідовності SEQ ID NO:25-43 та 90 у таблиці 9, або поліпептиди, що мають амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична будь-якій з послідовностей SEQ ID NO:25-43 та 90.

Кращим одновалентним поліпептидом є поліпептид, що позначений 137B7 та містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:36, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90% або щонайменше на 95% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:36. У кращому варіанті здійснення винаходу каркасні області SEQ ID NO:36 мають одну або декілька послідовність-оптимізуючих амінокислотних замінів. Іншими кращими одновалентними поліпептидами є поліпептиди, позначені 127D1, 2B2, 54B12, 97A9, 163D2 та 163E3, включаючи поліпептиди, що мають оптимізовану послідовність у каркасних областях.

Наприклад, 127D1 може містити амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37, у яку були введено одна або декілька послідовність-оптимізуючих амінокислотних замінів, представлених у таблиці 26, переважно, поліпептид містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:216.

Поліпептид 2B2 може містити амінокислотну послідовність SEQ ID NO:43, у яку були введені одна або декілька послідовність-оптимізуючих замінів, представлених у таблиці 20, переважно, поліпептид містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:213 або 214.

Поліпептид 54B12 може містити послідовність SEQ ID NO:90, у яку були введені одна або декілька послідовність-оптимізуючих замінів, представлених у таблиці 30, переважно, поліпептид містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:219.

Поліпептид 97A9 може містити послідовність SEQ ID NO:39, у яку були введені одна або декілька послідовність-оптимізуючих замінів, представлених у таблиці 22, переважно, поліпептид містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:215.

Поліпептид 163D2 може містити амінокислотну послідовність SEQ ID NO:41, у яку були введені одна або декілька послідовність-оптимізуючих замінів, представлених у таблиці 28, переважно, поліпептид містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:218.

Поліпептид 163E3 може містити амінокислотну послідовність SEQ ID NO:42, у яку були введені одна або декілька послідовність-оптимізуючих замінів, представлених у таблиці 24, переважно, поліпептид містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:217.

У цей аспект винаходу також входять одновалентні поліпептиди, зокрема, імуноглобуліни з одними варіабельними доменами, такі як нанотіла, що мають здатність перехресно блокувати зв'язування CXCR2 з поліпептидом, що має будь-яку амінокислотну послідовність із SEQ ID NO: 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47 або 61.

Будь-яке з обговорюваних вище кращих одновалентних нанотіл, зокрема, 137B7, може бути використане у описаних у даному документі цілях, наприклад, для лікування ХОХЛ.

Біпаратопні поліпептиди відповідно до винаходу, зокрема, кращі окремі варіабельні домени біпаратопного імуноглобуліну, обговорювані вище, включаючи всі їх верблужі та гуманізовані варіанти, являють собою модулятори CXCR2, які, зокрема, інгібують передачу CXCR2-сигналу.

Переважно, CDR-послідовності та FR-послідовності у біпаратопних поліпептидах, зокрема, у окремих варіабельних доменах біпаратопного імуноглобуліну відповідно до винаходу, відрізняються тим, що вони:

зв'язуються з CXCR2 з константою дисоціації ( $K_D$ ), що становить  $10^{-5}$ - $10^{-12}$  моль/літр або менше, переважно,  $10^{-7}$ - $10^{-12}$  моль/літр або менше, а більш переважно,  $10^{-8}$ - $10^{-12}$  моль/літр (тобто, з константою асоціації ( $K_A$ )  $10^5$ - $10^{12}$  літрів/моль або більше, переважно,  $10^7$ - $10^{12}$  літрів/моль або більше, а більш переважно,  $10^8$ - $10^{12}$  літрів/моль);

та/або тим, що вони:

зв'язуються з CXCR2 з константою швидкості асоціації  $k_{on}$ , складовій від  $10^2$   $M^{-1}s^{-1}$  та приблизно до  $10^7$   $M^{-1}s^{-1}$ ; переважно, від  $10^3$   $M^{-1}s^{-1}$  до  $10^7$   $M^{-1}s^{-1}$ ; більш переважно, від  $10^4$   $M^{-1}s^{-1}$  до  $10^7$   $M^{-1}s^{-1}$ ; а саме, від  $10^5$   $M^{-1}s^{-1}$  до  $10^7$   $M^{-1}s^{-1}$ ;

та/або тим, що вони:

зв'язуються з CXCR2 з константою швидкості дисоціації  $k_{off}$ , що становить від  $1$   $s^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0,69$  сек) до  $10^{-6}$   $s^{-1}$  (з утворенням майже необоротного комплексу з  $t_{1/2}$ , що становлять кілька днів), переважно, від  $10^{-2}$   $s^{-1}$  до  $10^{-6}$   $s^{-1}$ , більш переважно, від  $10^{-3}$   $s^{-1}$  до  $10^{-6}$   $s^{-1}$ , а саме,  $10^{-4}$   $s^{-1}$  до  $10^{-6}$   $s^{-1}$ .

Переважно, щоб CDR-послідовності та FR-послідовності, що присутні у поліпептидах та у окремих варіабельних доменах біпаратопного імуноглобуліну відповідно до винаходу, зв'язувалися з CXCR2 з афінністю менше, ніж 500 нМ, переважно, менше, ніж 200 нМ, більш переважно, менше, ніж 10 нМ, наприклад, менше, ніж 500 нМ.

Зокрема, як описано в прикладах, кращі біпаратопні нанотіла відповідно до винаходу здатні інгібувати зв'язування Gro- $\alpha$  з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 нМ. Кращі біпаратопні нанотіла відповідно до винаходу можуть також інгібувати індуковане агоністом (Gro- $\alpha$ ) вивільнення Ca з CXCR2-несучих еритроцитів (RBL) з IC50 менше, ніж 100 нМ. Кращі біпаратопні нанотіла відповідно до винаходу можуть також інгібувати індуковану агоністом (Gro- $\alpha$ ) акумуляцію [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S у CXCR2-CHO-мембранах з IC50 менше, ніж 50 нМ. Кращі біпаратопні нанотіла відповідно до винаходу можуть також інгібувати зміну форми лейкоцитів людини після Gro- $\alpha$ -обробки з IC50 менше, ніж <1 нМ, або зміну форми лейкоцитів собакоподібних мавп із IC50 менше, ніж <2 нМ.

Відповідно до найбільш кращого аспекту винаходу, біпаратопний поліпептид відповідно до винаходу, такий як один варіабельний домен біпаратопного імуноглобуліну, наприклад, описане у даному документі нанотіло, перехресно блокує зв'язування із CXCR2-поліпептидом, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1 та з будь-яким або з усіма поліпептидами з SEQ ID NO:58, 59, 62, 63, 64, 65, 47 або 61. Перехресне блокування може бути виміряне за будь-якими способами, добре відомими фахівцям.

Поліпептиди відповідно до винаходу, що підходять для використання у фармацевтиці, наприклад, поліпептид, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1; переважно, повинен бути спрямований безпосередньо проти CXCR2 людини, а поліпептиди відповідно до винаходу, що підходять для їхнього використання у ветеринарії, переважно, повинні бути спрямовані проти CXCR2 тварини, що походить від виду, що зазнає лікування, або вони повинні бути здатні перехресно реагувати з CXCR2 тварини, що походить від виду, що піддається лікуванню.

Крім того, біпаратопний поліпептид відповідно до винаходу може, крім щонайменше двох антигензв'язуючих доменів, що зв'язуються з CXCR2, містити, але необов'язково, один або декілька додаткових сайтів зв'язування або доменів, що зв'язуються з іншими епітопами, антигенами, білками або мішенями.

Ефективність поліпептидів відповідно до винаходу та композицій, що містять зазначені поліпептиди, може бути протестована за допомогою будь-якого підходящого аналізу *in vitro*, клітинного аналізу, аналізу *in vivo* та/або за допомогою аналізу на тварині-моделі, відомого *per se*, або за допомогою будь-яких комбінацій цих аналізів, де зазначені аналізи дозволяють визначити, що такий поліпептид може бути використаний для лікування ХОХЛ або будь-якого іншого захворювання, пов'язаного з порушенням передачі CXCR2-сигналу. Підходящі аналізи та тварини-моделі відомі фахівцям.

Крім того, відповідно до даного винаходу, поліпептиди, спрямовані проти CXCR2 людини, можуть перехресно реагувати, а можуть і не реагувати з CXCR2, що походять від теплокровних тварин одного або декількох інших видів. Однак, поліпептиди відповідно до винаходу, спрямовані проти CXCR2 людини та використовувані у тестах на токсичність, переважно, повинні перехресно реагувати з CXCR2, що походять від приматів одного або декількох інших видів (таких як, але не обмежуваних ними, мавпи, що належать до роду *Macaca* (такі як, зокрема, собакоподібні мавпи (*Macaca fascicularis*) та/або макак-резус (*Macaca mulatta*)) та павіанів (*Papio ursinus*)). Кращою перехресною реактивністю є реактивність із CXCR2 собакоподібних мавп. При цьому, може виявитися бажаною перехресна реактивність із CXCR2, що походять від тварин одного або декількох видів, які часто використовуються як модель захворювання (наприклад, миші, щури, кролики, свині або собаки), зокрема, тварини з моделлю захворювань та розладів, пов'язаних з CXCR2. Відповідно до цього, для фахівця у даній галузі очевидно, що така перехресна реактивність, якщо вона існує, може мати перевагу з погляду розробки лікарських засобів, оскільки це дозволяє протестувати амінокислотні послідовності та поліпептиди, спрямовані проти CXCR2 людини, на зазначених тваринах з моделлю захворювання.

Більш конкретно, поліпептиди відповідно до винаходу, які перехресно реагують із CXCR2 від ссавців багатьох видів, звичайно мають переваги при їхньому застосуванні у ветеринарії, оскільки у цьому випадку, той самий поліпептид може реагувати з CXCR2 багатьох видів.

Переважно, щоб біпаратопні поліпептиди відповідно до винаходу були нездатні перехресно реагувати з CXCR1 або CXCR4.

У біпаратопних поліпептидах відповідно до винаходу, щонайменше один антигензв'язуючий сайт може бути спрямований безпосередньо проти сайту взаємодії, тобто, сайту, у якому

CXCR2 взаємодіє з іншою молекулою, наприклад, з його природним лігандом або лігандами.

Біпаратопний поліпептид, наприклад, один варіабельний домен імуноглобуліну відповідно до винаходу, може являти собою поліпептид, у якому другий антигензв'язуючий домен, що не зв'язується з лінійним пептидом SEQ ID NO:7, розпізнає епітоп, що містить пептиди, представлені у SEQ ID NO:8, 9, 10, 11 або 12, або що знаходяться у цих пептидах. Крім того, перший антигензв'язуючий домен може розпізнавати епітоп, що містить пептид SEQ ID NO:7 або що знаходиться у цьому пептиді.

У деяких варіантах здійснення винаходу, що відносяться до перехресної реакції з CXCR2 собакоподібних мавп, перший антигензв'язуючий домен також розпізнає епітоп, що містить пептид SEQ ID NO:4 або що знаходиться у цьому пептиді. У такому варіанті здійснення винаходу другий антигензв'язуючий домен може розпізнавати епітоп, що містить пептиди SEQ ID NO:5 або 6 або що знаходиться в цих пептидах.

У обсяг даного винаходу також входять біпаратопні поліпептиди інших типів, зокрема, біпаратопні нанотіла, які, в основному, зв'язуються з усіма природними або синтетичними аналогами, варіантами, мутантами, алелями, частинами та фрагментами CXCR2; або щонайменше з аналогами, варіантами, мутантами, алелями, частинами та фрагментами CXCR2, що містять одну або декілька антигенних детермінант, або один або декілька епітопів, які, по суті, аналогічні антигенній(им) детермінанті(ам) або епітопу(ам), з якими зв'язуються поліпептиди відповідно до винаходу у CXCR2 (наприклад, у CXCR2 дикого типу SEQ ID NO:1). У цьому випадку, поліпептиди відповідно до винаходу можуть зв'язуватися із зазначеними аналогами, варіантами, мутантами, алелями, частинами та фрагментами з афінністю та/або специфічністю, аналогічними афінності та/або специфічності зв'язування поліпептидів відповідно до винаходу з CXCR2 (дикого типу), як обговорюється вище, або одмінними від них (тобто з більш високою або більш низькою афінністю або специфічністю).

Крім того, як відомо фахівцям у даній галузі, біпаратопні поліпептиди зв'язуються з CXCR2 з більшою авідністю, ніж відповідний поліпептид з одним антигензв'язуючим доменом.

Крім того, у обсяг даного винаходу також входять частини, фрагменти, аналоги, мутанти, варіанти, алелі та/або похідні біпаратопних поліпептидів, зокрема, окремих варіабельних доменів біпаратопного імуноглобуліну відповідно до винаходу, що використовуються у різних обговорюваних у даному документі терапевтичних цілях, за умови, що вони включають релевантні функціональні домени, еквівалентні доменам повнорозмірного поліпептиду. Такі частини, фрагменти, аналоги, мутанти, варіанти, алелі або похідні можуть мати всі функціональні властивості, обговорювані вище для біпаратопних поліпептидів відповідно до винаходу.

У іншому своєму аспекті, даний винахід відноситься до біпаратопного поліпептиду, необов'язково, до окремих варіабельних доменів біпаратопного імуноглобуліну, який також, але необов'язково, містить одну або декілька інших груп, залишків, молекул або зв'язуючих одиниць. Такі додаткові групи, залишки, молекули або амінокислотні послідовності можуть повідомляти, а можуть і не повідомляти, додаткові функції поліпептиду відповідно до винаходу та можуть модифікувати, а можуть і не модифікувати його властивості.

Наприклад, такими додатковими групами, залишками, молекулами або зв'язуючими одиницями можуть бути одна або декілька додаткових амінокислотних послідовностей, таких як (злитий) білок або (злитий) поліпептид. У кращому, але не обмежуючому аспекті винаходу, зазначені одна або декілька інших груп, залишків, молекул або зв'язуючих одиниць являють собою послідовності імуноглобуліну. Ще більш переважно, зазначені одна або декілька інших груп, залишків, молекул або зв'язуючих одиниць вибрані із групи, що складається з доменних антитіл, амінокислотних послідовностей, які можуть бути використані як доменне антитіло; односторонні антитіла, амінокислотних послідовностей, які можуть бути використані як односторонні антитіла; "dAb"; амінокислотних послідовностей, які можуть бути використані як dAb, або нанотіла.

Альтернативно, такими групами, залишками, молекулами або зв'язуючими одиницями можуть бути, наприклад, хімічні групи, залишки, молекули, які, самі по собі, можуть мати, а можуть і не мати біологічної та/або фармакологічної активності. Наприклад, такі групи можуть бути пов'язані з одним або декількома поліпептидами відповідно до винаходу з утворенням "похідної" поліпептиду відповідно до винаходу, також описаної у даній заявці.

У таких конструкціях, один або кілька поліпептидів відповідно до винаходу та одна або кілька груп, залишків, молекул або зв'язуючих одиниць можуть бути зв'язані один з одним безпосередньо та/або за допомогою одного або декількох підходящих лінкерів або спейсерів. Так, наприклад, якщо одна або кілька груп, залишків, молекул або зв'язуючих одиниць являють собою амінокислотні послідовності, тоді лінкерами можуть бути також амінокислотні

послідовності, що утворюють конструкції, такі як злитий білок або злитий поліпептид.

Як очевидно з вищенаведеного та нижчеподаного опису, це означає, що біпаратопні поліпептиди відповідно до винаходу можуть бути використані як "структурний блок", що утворює інші поліпептиди відповідно до винаходу, тобто, за допомогою їхнього комбінування з іншими групами, залишками, молекулами або зв'язуючими одиницями з одержанням описаних у даному документі конструкцій, які є мультипаратопними та, необов'язково, полівалентними або мультиспецифічними, бі/полівалентними та бі/мультиспецифічними.

Поліпептиди цього аспекту винаходи можуть бути отримані, в основному, методом, який включає щонайменше одну стадію відповідного зв'язування одного або декількох поліпептидів відповідно до винаходу з однією або декількома іншими групами, залишками, молекулами або зв'язуючими одиницями за допомогою, але необов'язково, одного або декількох підходящих лінкерів.

У одному конкретному аспекті винаходу, біпаратопний поліпептид відповідно до винаходу модифікований таким чином, щоб він сприяв збільшенню часу напівжиття у порівнянні з відповідним немодифікованим поліпептидом відповідно до винаходу. Виходячи із приведеного у даному документі опису, для фахівця очевидно, що деякими кращими поліпептидами є такі поліпептиди, які, наприклад, містять амінокислотні послідовності, або поліпептиди відповідно до винаходу, які були хімічно модифіковані з метою збільшення часу напівжиття (наприклад, за допомогою ПЕГілювання, ПАСилювання або ГЕКілювання); причому, поліпептиди відповідно до винаходу можуть містити щонайменше один додатковий сайт зв'язування із сироватковим білком (таким як сироватковий альбумін); або поліпептиди відповідно до винаходу можуть містити щонайменше одну амінокислотну послідовність, зв'язану щонайменше з однією молекулою (зокрема, щонайменше з однією амінокислотою послідовністю), яка сприяє збільшенню часу напівжиття поліпептиду відповідно до винаходу. Прикладами поліпептидів відповідно до винаходу, що містять такі молекули або амінокислотні послідовності, що сприяють збільшенню часу напівжиття, є поліпептиди, які відповідним чином пов'язані з одним або декількома сироватковими білками, або їх фрагментами (такими як сироватковий альбумін (людини) або його підходящі фрагменти) або з однією або декількома зв'язуючими одиницями, які можуть зв'язуватися із сироватковими білками, такими як, наприклад, доменні антитіла, амінокислотні послідовності, які можуть бути використані як доменне антитіло; однодоменні антитіла, амінокислотні послідовності, які можуть бути використані як однодоменне антитіло; "dAb", амінокислотні послідовності, які можуть бути використані як dAb, або нанотіла, які можуть зв'язуватися із сироватковими білками, такими як сироватковий альбумін (такий як альбумін сироватки людини), сироваткові імуноглобуліни, такі як IgG, або трансферин; поліпептиди, які пов'язані з Fc-частиною (такою як Fc людини) або їх підходящі частини, або фрагменти. У даний винахід також входять поліпептиди відповідно до винаходу, які пов'язані з одним або декількома невеликими білками або пептидами, які можуть зв'язуватися із сироватковими білками (такими як, але не обмежуваними ними, білки та пептиди, описані у WO 91/01743, WO 01/45746, WO 02/076489 та у попередній заявці США Ablynx N.V., озаглавленій "Peptides capable of binding to serum proteins" Ablynx N.V. та поданій 5 грудня 2006 року (див. також PCT/EP2007/063348)).

Один з найбільш широко використовуваних методів збільшення часу напівжиття та/або зниження імуногенності фармацевтичних білків включає приєднання підходящого фармакологічно прийнятного полімеру, такого як поліетиленгліколь (ПЕГ) або його похідні (такі як метоксиполіетиленгліколь) або мПЕГ). Як правило, може бути використана будь-яка форма ПЕГілювання, така як ПЕГілювання, використовуване для антитіл та фрагментів антитіл (включаючи, але не обмежуючись ними, (одно)доменні антитіла та scFv), та опис такого ПЕГілювання можна знайти, наприклад, у публікаціях 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) та у WO 04/060965. Пізні реагенти для ПЕГілювання білків також є комерційно доступними, наприклад, вони поставляються від Nektar Therapeutics, USA.

При цьому, переважно, використовувати сайт-спрямоване ПЕГілювання, зокрема, ПЕГілювання з використанням цистеїнового залишку (див., наприклад, Yang et al., Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003). Наприклад, для цих цілей, ПЕГ може бути приєднаний до цистеїнового залишку, який звичайно є присутнім у біпаратопному нанотілі відповідно до винаходу. Біпаратопний поліпептид відповідно до винаходу може бути модифікований з метою відповідного введення одного або декількох цистеїнових залишків для приєднання ПЕГ, або амінокислотна послідовність, що містить один або декількох цистеїнових залишків для приєднання ПЕГ, може бути пов'язана з N- та/або C-кінцем біпаратопного поліпептиду, де всі ці методи конструювання білків відомі фахівцям per se.

Для окремих варіабельних доменів біпаратопного імуноглобуліну та поліпептидів відповідно

до винаходу, переважно, використовувати ПЕГ з молекулярною масою більш ніж 5000, а саме, більш, ніж 10000 та менше, ніж 200000, зокрема, менше, ніж 100000, наприклад, у інтервалі 20000-80000.

5 ПЕГілюванню можуть бути піддані один або обидва варіабельні домени імуноглобуліну та/або будь-яка лінкерна область пептиду. Підходящі методи ПЕГілювання описані у EP 1639011.

10 Як альтернатива ПЕГ, час напівжиття може бути збільшений методом, відомим як ГЕКілювання, яке включає приєднання похідних гідроксиетильованого крохмалю (ГЕК) до поліпептидів відповідно до винаходу. Використовуванням гідроксиетильованим крохмалем є амілопектин, що походить від крохмалю восковидної кукурудзи, який був модифікований за допомогою кислотного гідролізу для корекції молекулярної маси, та у якому залишки глюкози були гідроксиетильовані. Більш докладний опис можна знайти у публікації Pavisic R, et al., Int. J. Pharm (2010) March 15, 387 (1-2):110-9.

15 Загалом, кращі поліпептиди відповідно до винаходу зі збільшеним часом напівжиття мають час напівжиття, який щонайменше у 1,5 рази, переважно, щонайменше у 2 рази, а саме, щонайменше у 5 разів, наприклад, щонайменше у 10 разів або більше, ніж у 20 разів перевищує час напівжиття відповідного поліпептиду відповідно до винаходу *per se*. Наприклад, поліпептиди відповідно до винаходу зі збільшеним часом напівжиття мають час напівжиття, який щонайменше на 1 годину, переважно, більше, ніж на 2 години, більш переважно, більше, ніж на 20 6 годин, а саме більше, ніж на 12 годин або навіть більше, ніж на 24, 48 або 72 години перевищує час напівжиття відповідного поліпептиду відповідно до винаходу *per se*.

20 У кращому аспекті винаходу, такі поліпептиди відповідно до винаходу мають час напівжиття у сироватці, який щонайменше на 1 годину, переважно, більше, ніж на 2 години, більш переважно, більше, ніж на 6 годин, а саме більше, ніж на 12 годин або навіть більше, ніж на 24, 25 48 або 72 години перевищує час напівжиття відповідних поліпептидів відповідно до винаходу *per se*.

У іншому кращому аспекті винаходу, поліпептиди відповідно до винаходу мають час напівжиття у сироватці людини, що становить щонайменше приблизно 12 годин, переважно, щонайменше 24 години, більш переважно, щонайменше 48 годин, а ще більш переважно, 30 щонайменше 72 години або більше. Наприклад, поліпептиди відповідно до винаходу можуть мати час напівжиття, що становить щонайменше 5 днів (а саме, приблизно 5-10 днів), переважно, щонайменше 9 днів (а саме, приблизно 9-14 днів), більш переважно, щонайменше приблизно 10 днів (а саме, приблизно 10-15 днів) або щонайменше приблизно 11 днів (а саме, приблизно 11-16 днів), більш переважно, щонайменше приблизно 12 днів (а саме, приблизно 12-18 днів або більше), або більше, ніж 14 днів (а саме, приблизно 14-19 днів). 35

Даний винахід також відноситься до способів одержання або продукування описаних у даному документі поліпептидів, нуклеїнових кислот, клітин-хазяїв та композицій відповідно до винаходу.

Загалом, такі способи можуть включати стадії:

40 а) одержання серії, набору або бібліотеки поліпептидів; та  
б) скринінгу зазначених серій, наборів або бібліотек поліпептидів на амінокислотні послідовності, які можуть зв'язуватися з CXCR2 та/або мають афінність до CXCR2; та  
с) виділення амінокислотної(их) послідовності(ей), яка(і) може (можуть) зв'язуватися з CXCR2 та/або має(ють) афінність до CXCR2.

45 Серія, набір або бібліотека поліпептидів можуть являти собою серію, набір або бібліотеку послідовностей імуноглобуліну (описаних у даній заявці), такі як наївна серія, набір або бібліотека послідовностей імуноглобуліну; синтетичні або напівсинтетичні серії, набір або бібліотека послідовностей імуноглобуліну; та/або серія, набір або бібліотека послідовностей імуноглобуліну, які були піддані дозріванню афінності.

50 Крім того, у цьому способі, серією, набором або бібліотекою поліпептидів можуть бути серія, набір або бібліотека варіабельних доменів важкого ланцюгу (таких як  $V_H$ -домени або  $V_{HH}$ -домени) або варіабельних доменів легкого ланцюгу. Наприклад, серією, набором або бібліотекою поліпептидів можуть бути серія, набір або бібліотека доменних антитіл або односторонніх антитіл, або ними можуть бути серія, набір або бібліотека амінокислотних 55 послідовностей, які здатні функціонувати як доменне антитіло або одностороннє антитіло.

У кращому аспекті цього способу, серією, набором або бібліотекою поліпептидів можуть бути імунна серія, набір або бібліотека послідовностей імуноглобуліну, що походить, наприклад, від ссавця, наприклад, від лами, яка була відповідним чином імунізована рецептором CXCR2 або відповідною антигенною детермінантою, отриманою на його основі або, що походить від 60 нього, така як антигенна ділянка, антигенний фрагмент, антигенна область, антигенний домен,



антигенна петля або інші їх епітопи.

У вищеописаних способах, для полегшення скринінгу, серія, набір або бібліотека пептидів або поліпептидів можуть бути представлені на фазі, фагміді, рибосомі або на підходящому мікроорганізмі (такому як дріжджі). Підходящі способи, технології та організми-хазяї, використовувані для представлення та скринінгу (серії, набору або бібліотеки) амінокислотних послідовностей, можуть бути вибрані фахівцем, наприклад, виходячи з даного опису. Фахівець може також звернутися до публікації Hoogenboom in Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005).

У іншому аспекті винаходу, спосіб одержання поліпептидів для їхнього використання з метою конструювання біпаратопного поліпептиду відповідно до винаходу включає щонайменше одну з наступних стадій:

а) одержання набору або зразку клітин, що експресують поліпептиди;

б) скринінгу зазначеного набору або зразку клітин з метою виявлення клітин, що експресують поліпептид, який здатний зв'язуватися з CXCR2 та/або має афінність до CXCR2; та

с) або (i) виділення зазначеного поліпептиду; або (ii) виділення із зазначеної клітини послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує зазначений поліпептид, та здійснення наступної експресії зазначеного поліпептиду.

Наприклад, якщо кращим поліпептидом є послідовність імуноглобуліну, тоді таким набором або зразком клітин можуть бути, наприклад, набір або зразок В-клітин. Крім того, у цьому способі, зразки клітин можуть бути отримані від ссавця, наприклад, від лами, яка була відповідним чином імунізована рецептором CXCR2 або відповідною антигенною детермінантою, яка отримана на його основі або яка походить від нього, така як антигенна ділянка, антигенний фрагмент, антигенна область, антигенний домен, антигенна петля або інші їх епітопи. У одному конкретному аспекті винаходу, зазначеною антигенною детермінантою можуть бути позаклітинні ділянки, області, домени, петлі або інші позаклітинні епітопи.

Для одержання кращих біпаратопних нанотіл відповідно до винаходу, описаних у даній заявці, ламу імунізують клітинами ссавця, що експресують CXCR2 людини; клітинами ссавця, що експресують CXCR2 собакоподібних мавп; ДНК, що кодує повнорозмірний CXCR2 людини; ДНК, що кодує  $\Delta 1-17$  CXCR2 людини; ДНК, що кодує CXCR2 собакоподібних мавп, та пептидами, представленими у таблиці 5.

Описаний вище скринінг може бути здійснений за будь-яким підходящим способом, відомим фахівцеві. Опис таких способів можна знайти, наприклад, у EP 0542810, WO 05/19824, WO 04/051268 і WO 04/106377. Стадію скринінгу (b), переважно, здійснюють за способом проточної цитометрії, таким як FACS. Опис цього способу можна знайти, наприклад, у публікації Lieby et al., Blood, Vol. 97, No. 12, 3820 (2001).

У іншому аспекті винаходу, спосіб одержання поліпептиду, спрямованого проти CXCR2, з метою його використання для конструювання поліпептиду відповідно до винаходу, може містити щонайменше одну з нижченаведених стадій:

а) одержання серії, набору або бібліотеки послідовностей нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид;

б) скринінгу зазначених серії, набору або бібліотеки послідовностей нуклеїнової кислоти, що кодує амінокислотну послідовність, яка може зв'язуватися з CXCR2 та/або має афінність до CXCR2; та

с) виділення зазначеної послідовності нуклеїнової кислоти та здійснення наступної експресії зазначеного поліпептиду.

У такому способі, серією, набором або бібліотекою послідовностей нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, можуть бути, наприклад, серія, набір або бібліотека послідовностей нуклеїнової кислоти, що кодує природну серію, набір або бібліотеку послідовностей імуноглобуліну; серія, набір або бібліотека послідовностей нуклеїнової кислоти, що кодують синтетичну або напівсинтетичну серію, набір або бібліотеку послідовностей імуноглобуліну; та/або серія, набір або бібліотека послідовностей нуклеїнової кислоти, що кодують серію, набір або бібліотеку послідовностей імуноглобуліну, які були піддані дозріванню афінності.

Крім того, у цьому способі, серія, набір або бібліотека послідовностей нуклеїнової кислоти можуть кодувати серію, набір або бібліотеку варіабельних доменів важкого ланцюгу (таких як  $V_H$ -домени або  $V_{HH}$ -домени) або варіабельних доменів легкого ланцюгу. Наприклад, серія, набір або бібліотека послідовностей нуклеїнової кислоти можуть кодувати серію, набір або бібліотеку доменних антитіл, або однодомених антитіл, або серію, набір або бібліотеку амінокислотних послідовностей, які здатні функціонувати як доменне антитіло або однодомених антитіло.

У кращому аспекті цього способу, серією, набором або бібліотекою послідовностей нуклеїнової кислоти можуть бути імунна серія, імунний набір або імунна бібліотека

послідовностей нуклеїнової кислоти, що походять, наприклад, від ссавців, які були відповідним чином імунізовані рецептором CXCR2 або відповідною антигенною детермінантою, отриманою на його основі або, що походить від нього, така як антигенна ділянка, антигенний фрагмент, антигенна область, антигенний домен, антигенна петля або інші їх епітопи. У одному конкретному аспекті винаходу, зазначеною антигенною детермінантою можуть бути позаклітинні ділянки, області, домени, петлі або інші позаклітинні епітопи.

При одержанні поліпептидів відповідно до винаходу, лам імунізують антигенами, як описано вище.

У вищеописаних способах, для полегшення скринінгу, серія, набір або бібліотека послідовностей нуклеїнової кислоти можуть бути представлені на фазі, фагміді, рибосомі або на підходящому мікроорганізмі (такому як дріжджі). Підходящі способи, технології та організми-хазяї, використовувані для представлення та скринінгу (серії, набору або бібліотеки) нуклеотидних послідовностей, що кодують амінокислотні послідовності, можуть бути вибрані фахівцем, наприклад, виходячи з даного опису. Фахівець може також звернутися до публікації Hoogenboom in Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005).

У іншому аспекті винаходу, спосіб одержання поліпептиду, який спрямований проти CXCR2 та який може бути використаний у біпаратопних поліпептидах відповідно до винаходу, може включати щонайменше одну з наступних стадій:

а) одержання серії, набору або бібліотеки послідовностей нуклеїнової кислоти, що кодують поліпептиди;

б) скринінгу зазначених серії, набору або бібліотеки послідовностей нуклеїнової кислоти, що кодують амінокислотну послідовність, яка може зв'язуватися з CXCR2 та/або має афінність до CXCR2, та яка перехресно блокується біпаратопним нанотілом відповідно до винаходу або перехресно блокує біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу, наприклад, що кодується послідовностями SEQ ID NO:58, 59, 62, 63, 64, 65, 47 або 61; та

с) виділення зазначеної послідовності нуклеїнової кислоти та наступного здійснення експресії зазначеного поліпептиду.

Даний винахід також відноситься до біпаратопних поліпептидів, які можуть бути отримані вищеописаними способами, або альтернативно, способом, який включає проведення однієї з вищеописаних стадій, та крім того, щонайменше стадій визначення нуклеотидної послідовності або амінокислотної послідовності зазначеної послідовності імуноглобуліну та експресії або синтезу зазначеної амінокислотної послідовності способом, відомим *per se*, наприклад, експресії у підходящій клітині-хазяїні або у організмі-хазяїні, або стадій хімічного синтезу та конструювання біпаратопного поліпептиду на основі продуктів цього синтезу.

Вищевказаний спосіб може бути здійснений із застосуванням будь-якої підходящої технології, відомої фахівцям та більш докладно обговорюваної нижче. Опис таких способів можна знайти, наприклад, у EP 0542810, WO 05/19824, WO 04/051268 та WO 04/106377. Наприклад, стадію скринінгу (b), переважно, здійснюють за способом проточної цитометрії, такої як FACS. Опис цього способу можна знайти, наприклад, у публікації Lieby et al., Blood, Vol. 97, No. 12, 3820. Конкретний опис так званого способу "Nanoclone™" можна знайти у Міжнародній заявці WO 06/079372, Ablynx N.V.

Інший спосіб одержання послідовностей  $V_{HH}$  або послідовностей нанотіл, спрямованих проти CXCR2, включає відповідну імунізацію трансгенного ссавця, здатного експресувати антитіла з важким ланцюгом (тобто, імунізацію, проведену з метою підвищення імунної відповіді) та/або антитіла з важким ланцюгом, спрямовані безпосередньо проти CXCR2, одержання підходящого біологічного зразку від зазначеного трансгенного ссавця, який містить (кодуючі послідовності нуклеїнової кислоти) зазначені послідовності  $V_{HH}$  або послідовності нанотіла (де зазначеним зразком є проби крові, проби сироватки або зразок В-клітин), а потім одержання послідовностей  $V_{HH}$ , спрямованих проти CXCR2, із зазначеного зразку з використанням будь-якого підходящого способу, відомого *per se* (такого як будь-який з описаних у даному документі методів або гібридомний метод). Наприклад, для цих цілей можуть бути використані миші, експресуючі антитіло з важким ланцюгом, та можуть бути використані інші способи та технології, описані у WO 02/085945, WO 04/049794 та WO 06/008548, та у публікації Janssens et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006 Oct 10;103(41):15130-5. Наприклад, у такої миші, що експресує антитіло з важким ланцюгом, можуть експресуватися антитіла з важким ланцюгом, що містять будь-який підходящий (один) варіабельний домен, наприклад, (окремі) варіабельні домени, що походять від природних джерел (наприклад, (окремі) варіабельні домени людини, верблюжі (окремі) варіабельні домени або (окремі) варіабельні домени акули), а також, наприклад, синтетичні або напівсинтетичні (окремі) варіабельні домени.

Фахівцям відомі й інші підходящі способи та технології одержання нанотіл,

використовуваних у даному винаході, та/або нуклеїнових кислот, що кодують зазначені нанотіла, що походять від природних послідовностей  $V_H$  або, переважно, послідовностей  $V_{HH}$ , та, наприклад, опис таких методів можна знайти на сторінці 64 згаданої у даному документі заявки WO 08/00279A.

5 Домени  $V_{HH}$  або нанотіла можуть бути охарактеризовані за одним або декількома "ключовими залишками", присутніми у них FR. Ключовими залишками є залишки, які дозволяють ідентифікувати FR як FR, що походить від тваринних сімейства верблюжних, наприклад, від ламі. Відповідно до цього, ключовим залишком є бажана мішень для заміни, а переважно, заміни людськими залишками.

10 Відповідно до нумерації Kabat, ключові залишки можуть бути присутніми у положеннях 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 або 108 у нанотілі. Необмежуючі приклади (їх підходящі комбінації) таких каркасних послідовностей та альтернативних ключових залишків приводяться на сторінках 65-98 заявки WO 2008/020079, які у всій своїй повноті вводяться у даний опис як посилання. У даному винаході також розглядаються й інші відомі фахівцям гуманізовані або частково гуманізовані послідовності, які входять у обсяг даного винаходу.

15 Як уже обговорювалося вище, нанотіло, використовуване у даному винаході, може мати щонайменше "відмінність у одній амінокислоті" (як визначено у даній заявці) щонайменше у одній з каркасних областей у порівнянні з відповідною каркасною областю природного  $V_H$ -домену людини, зокрема, у порівнянні з відповідною каркасною областю DP-47. Більш конкретно, відповідно до одного з необмежуючих аспектів винаходу, нанотіло може мати щонайменше "відмінність у одній амінокислоті" (як визначено у даній заявці) щонайменше у одному із ключових залишків (включаючи залишки у положеннях 108, 103 та/або 45) у порівнянні з відповідною каркасною областю природного людського  $V_H$ -домену, зокрема, у порівнянні з відповідною каркасною областю DP-47. Звичайно, нанотіло має щонайменше відмінність у одній такій амінокислоті у природному  $V_H$ -домени щонайменше у одній з FR2 та/або FR4, зокрема, щонайменше у одному із ключових залишків у FR2 та/або FR4 (також включаючи залишки у положеннях 108, 103 та/або 45).

Крім того, гуманізоване нанотіло відповідно до винаходу може бути таким, як воно визначене у даному описі, за умови, що воно має щонайменше "відмінність у одній амінокислоті" (як визначено у даній заявці) щонайменше у одній з каркасних областей у порівнянні з відповідною каркасною областю природного  $V_{HH}$ -домену. Більш конкретно, відповідно до одного з необмежуючих аспектів винаходу, нанотіло з гуманізованою або якою-небудь інакше оптимізованою послідовністю може бути таким, як воно визначене у описі даної заявки, за умови, що воно буде мати щонайменше "відмінність у одній амінокислоті" (як визначено у даній заявці) щонайменше у одному із ключових залишків (включаючи залишки у положеннях 108, 103 та/або 45) у порівнянні з відповідною каркасною областю природного  $V_{HH}$ -домену. Звичайно, нанотіло з гуманізованою або інакше оптимізованою послідовністю має щонайменше відмінність у одній такій амінокислоті у природному  $V_{HH}$ -домени щонайменше у одній з FR2 та/або FR4, зокрема, щонайменше у одному із ключових залишків у FR2 та/або FR4 (також включаючи залишки у положеннях 108, 103 та/або 45).

Як буде очевидно зі даного опису, обсяг даного винаходу охоплює застосування природних або синтетичних аналогів, мутантів, варіантів, алелей, гомологів та ортологів (що називаються у даному документі загальним терміном "аналоги") одного варіабельного домену імуноглобуліну відповідно до винаходу, визначеного у даній заявці, зокрема, аналогів біпаратопних нанотіл SEQ ID NO:58, 59, 62, 63, 64, 65, 47, 61, 53, 54, 46, 69, 68, 67 або 66.

Як правило, у таких аналогах, один або кілька амінокислотних залишків можуть бути замінені, делетовані та/або додані у порівнянні з окремими варіабельними доменами імуноглобуліну відповідно до винаходу, визначеними у даній заявці. Такі заміни, інсерції або делеції можуть бути введені у одну, або кілька каркасних областей, та/або у одну або декілька CDR. Якщо такі заміни, інсерції або делеції були зроблено у одній або декількох каркасних областях, тоді вони можуть бути введені у положення одного або декількох ключових залишків та/або в одне або декілька інших положень каркасних залишків, хоча, по суті, заміни, інсерції або делеції у ключових залишках є менш кращими (якщо тільки вони не є підходящими гуманізуючими замінами, описаними у даній заявці).

55 У одному з необмежуючих прикладів, заміною може бути, наприклад, консервативна заміна (описана у даній заявці), та/або амінокислотний залишок може бути замінений іншим амінокислотним залишком, який звичайно є присутнім у тому ж самому положенні у іншому  $V_{HH}$ -домени (деякі необмежуючі приклади таких замін можна знайти у WO 2008/020079), хоча даний винахід не обмежується такою заміною. Таким чином, у обсяг даного винаходу входять будь-які одна або кілька замін, делецій або інсерцій або будь-які їхні комбінації, які або сприяють

поліпшенню властивостей, наприклад, нанотіла, використовуваного для одержання біпаратопного нанотіла відповідно до винаходу, або щонайменше суттєво не погіршують потрібні властивості або баланс або комбінацію потрібних властивостей відповідно до винаходу (тобто, не погіршують до того ступеня, коли нанотіло або біпаратопне нанотіло буде вже непридатним для його використання у потрібних цілях). Фахівець у даній галузі, по суті, може самостійно визначити та вибрати підходящі заміни, делеції або інсерції або підходящі їхні комбінації виходячи з наведеного у даному документі опису та, необов'язково, після нетрудомісткого рутинного експериментування, яке може, наприклад, включати введення обмеженого числа можливих замін та визначення їх впливу на властивості отриманих у такий спосіб нанотіл.

Наприклад, залежно від організму-хазяїна, використовуваного для експресії біпаратопного нанотіла або поліпептиду відповідно до винаходу, такі делеції та/або заміни можуть бути внесені таким чином, щоб були вилучені один або кілька сайтів післятрансляційної модифікації (такі як один або кілька сайтів глікозилювання), та такі делеції та/або заміни можуть бути легко здійснені фахівцем у даній галузі. Альтернативно, заміни або інсерції можуть бути зроблені для введення одного або декількох сайтів приєднання функціональних груп (як описано у даній заявці), наприклад, для сайт-специфічного ПЕГілювання (як описано у даній заявці).

Як описано загалом у даній заявці, добір найбільш сприятливих замін, інсерцій або делецій, для введення у амінокислотну послідовність із метою повідомлення конкретних властивостей або структурних особливостей, які відсутні у нативній послідовності, включаючи "гуманізуючі" заміни, називається "оптимізацією послідовності". У цьому зв'язку можна звернутися до пункту (у) розділу "Визначення".

Кращими аналогами є такі аналоги, які можуть зв'язуватися з CXCR2 з афінністю (звичайно вимірюваною та/або що виражається як величина  $K_D$  (фактична або ймовірна), величина  $K_A$  (фактична або ймовірна), константа швидкості асоціації  $k_{on}$  та/або константа швидкості дисоціації  $k_{off}$ , або альтернативно, як величина  $IC_{50}$ , також докладно описані у даній заявці), яка визначена у даному описі для біпаратопних нанотіл відповідно до винаходу.

Кращими аналогами також є аналоги, які зберігають сприятливі властивості біпаратопних нанотіл, описаних у даній заявці.

Крім того, відповідно до одного із кращих аспектів даного винаходу, зазначені аналоги мають послідовність, яка щонайменше на 70%, переважно, щонайменше на 80%, більш переважно, щонайменше на 90%, а саме, щонайменше на 95% або 99% або більш ідентична одній з SEQ ID NO:58, 59, 62, 63, 64, 65, 47, 61, 53, 54, 46, 69, 68, 67 або 66 біпаратопних нанотіл; та/або переважно мають відмінності максимум у 20, переважно, максимум у 10, ще більш переважно, максимум у 5, а саме у 4, 3, 2 амінокислоти або тільки у 1 амінокислоту (як визначено у даній заявці) у порівнянні із однією з зазначених послідовностей біпаратопних нанотіл.

Крім того, каркасні послідовності та CDR зазначених аналогів, переважно, повинні відповідати визначеним у даному документі кращим аспектам винаходу. У більш широкому сенсі, як описано у даній заявці, аналоги мають (а) Q у положенні 108; та/або (b) заряджену амінокислоту або цистеїновий залишок у положенні 45, переважно, E у положенні 44, більш переважно, E у положенні 44 та R у положенні 45; та/або (c) P, R або S у положенні 103.

Аналоги біпаратопних  $V_{HH}$ -доменів або нанотіл одного із кращих класів відповідно до винаходу були гуманізовані (тобто, у порівнянні з послідовністю природного нанотіла). Як згадувалося вище, таке гуманізування, по суті, включає заміну одного або кілька амінокислотних залишків у послідовності природного  $V_{HH}$  амінокислотними залишками, які присутні у тому ж самому положенні  $V_H$ -домену людини, такого як  $V_H3$ -домен людини. Приклади можливих "гуманізуючих" замін, що відрізняються від замін, конкретно зазначених у таблицях 20, 22, 24, 26, 28 та 30, приводяться у даній заявці, хоча фахівцями можуть бути зроблені й інші комбінації гуманізуючих замін виходячи з порівняння послідовності нанотіла та послідовності природного  $V_H$ -домену людини та виходячи з опису заявки WO 2008/020079, уже процитованій у даній заявці.

Як правило, у результаті гуманізації, окремі варіабельні домени імуноглобуліну, зокрема, нанотіла відповідно до винаходу будуть більше нагадувати послідовності людини, але при цьому, будуть зберігати сприятливі властивості описаних у даному документі нанотіл відповідно до винаходу. У результаті, такі гуманізовані нанотіла можуть мати кілька переваг, наприклад, вони можуть мати знижену імуногенність у порівнянні з відповідними природними  $V_{HH}$ -доменами. І в цьому випадку, виходячи з наведеного у даному документі опису та, необов'язково, після нетрудомісткого рутинного експериментування, фахівець у даній галузі може самостійно вводити гуманізуючі заміни або підходящі комбінації гуманізуючих замін, які

дозволяють оптимізувати баланс або досягти потрібного або підходящого балансу між сприятливими властивостями, повідомлюваними гуманізуючими замінами, з одного боку, та сприятливими властивостями природних  $V_{HH}$ -доменів, з іншого боку.

Нанотіла, використовувані для введення у біпаратопні нанотіла відповідно до винаходу, можуть бути відповідним чином гуманізовані у будь-якому положенні каркасних залишків, наприклад, у одному або декількох положеннях ключових залишків (визначених у даній заявці), або у одному або декількох положеннях інших каркасних залишків (тобто, не-ключових залишків), або у будь-якій їхній підходящій комбінації. Однією із кращих гуманізуючих замін для нанотіла "групи P,R,S-103" або "групи KERE" є заміна Q108 на L108. Нанотіла "класу GLEW" можуть бути також гуманізовані шляхом заміни Q108 на L108 за умови, що щонайменше один з інших ключових залишків буде містити заміну верблужим залишком ("кемелізація") (як визначено у даній заявці). Наприклад, як згадувалося вище, гуманізовані нанотіла одного з найбільш кращих класів мають послідовність GLEW або GLEW-подібну послідовність у положеннях 44-47; P, R або S (зокрема, R) у положенні 103 та L у положенні 108.

Гуманізовані та інші аналоги, і послідовності нуклеїнової кислоти, що кодують ці аналоги, можуть бути отримані будь-яким способом, відомим *per se*, наприклад, із застосуванням одного або декількох методів, що згадуються на сторінках 103 та 104 заявки WO 08/020079.

Як згадувалося вище, фахівцеві у даній галузі також відомо, що окремі варіабельні домени імуноглобуліну відповідно до винаходу (включаючи їх аналоги) можуть бути сконструйовані та/або отримані з послідовностей  $V_H$  людини (тобто з амінокислотних послідовностей або відповідних нуклеотидних послідовностей), наприклад, з послідовностей  $V_{H3}$  людини, таких як DP-47, DP-51 або DP-29, шляхом введення однієї або декількох кемелізуючих замін (тобто, заміни одного або декількох амінокислотних залишків у амінокислотній послідовності зазначеного  $V_{HH}$ -домену людини на амінокислотні залишки, що присутні у відповідному положенні у  $V_{HH}$ -домени) для одержання послідовності нанотіла відповідно до винаходу та/або для надання отриманій у такий спосіб послідовності нанотіла сприятливих властивостей. Це може бути також здійснене з використанням різних способів та технологій, описаних у попередньому параграфі, з використанням амінокислотної послідовності та/або нуклеотидної послідовності для  $V_H$ -домену людини як вихідного елемента.

Деякі кращі, але необмежуючі, кемелізуючі заміни можна знайти у заявці WO 2008/020079. Також очевидно, що кемелізуючі заміни у одному або декількох ключових залишках, по суті, будуть робити більший вплив на потрібні властивості, ніж заміни у одному або декількох інших положеннях амінокислот, хоча у обсяг даного винаходу входять обидві ці заміни та будь-які підходящі їхні комбінації. Так, наприклад, можуть бути введені одна або декілька кемелізуючих замін, які вже надають щонайменше деяких потрібних властивостей, а потім можуть бути введені додаткові кемелізуючі заміни, які будуть ще більше поліпшувати зазначені властивості та/або будуть надавати додаткових сприятливих властивостей. І у цьому випадку, фахівець у даній галузі, по суті, може самостійно визначити та вибрати підходящі кемелізуючі заміни або підходящі комбінації кемелізуючих замін, виходячи з наведеного у даному документі опису та необов'язково, після нетрудомісткого рутинного експериментування, яке може, наприклад, включати введення обмеженого числа можливих кемелізуючих замін та визначення факту надання сприятливих властивостей окремим варіабельним доменам імуноглобуліну або поліпшення таких властивостей (у порівнянні із властивостями вихідного  $V_H$ -домену). Однак, як правило, кращими кемелізуючими замінами є такі заміни, при яких отримана амінокислотна послідовність щонайменше містить: (а) Q у положенні 108; та/або (b) заряджену амінокислоту або цистеїновий залишок у положенні 45, переважно, E у положенні 44, а більш переважно E у положенні 44 та R у положенні 45; та/або (c) P, R або S у положенні 103, та, необов'язково, одну або декілька додаткових кемелізуючих замін. Більш переважно, кемелізуючі заміни повинні бути введені таким чином, щоб це приводило до утворення одного варіабельного домену імуноглобуліну, використовуваного у даному винаході, та/або його аналогу (визначеного у даній заявці), такого як гуманізований аналог, та/або, переважно, аналог, визначений у попередніх параграфах.

Окремі варіабельні домени імуноглобуліну, такі як нанотіла, можуть бути також отримані з  $V_H$ -доменів шляхом введення замін, які рідко зустрічаються у природі, але проте, за своїм укладанням, мають структурну подібність із  $V_H$ -доменом. Так, наприклад, такими замінами можуть бути, але не обмежуються ними, одна або декілька з нижченаведених замін, таких як заміна Gly у положенні 35, Ser, Val або Thr у положенні 37, Ser, Thr, Arg, Lys, His, Asp або Glu у положенні 39, Glu або His у положенні 45, Trp, Leu, Val, Ala, Thr або Glu у положенні 47, S або R у положенні 50. (Barthelemy et al. J. Biol. Chem. 2008 Feb 8;283(6):3639-54. Epub. 2007 Nov. 28).

Даний винахід також включає похідні біпаратопних поліпептидів відповідно до винаходу. Такі

похідні можуть бути отримані, в основному, шляхом модифікації, зокрема, шляхом хімічної та/або біологічної (наприклад, ферментативної) модифікації біпаратопних поліпептидів відповідно до винаходу, та/або одного або декількох амінокислотних залишків, які утворюють біпаратопні поліпептиди відповідно до винаходу.

5 Приклади таких модифікацій, а також приклади амінокислотних залишків у поліпептидній послідовності, які можуть бути модифіковані у такий спосіб (тобто, або у білковому скелеті або, що переважно, у бічному ланцюзі), методи та технології, які можуть бути застосовані для введення таких модифікацій, а також можливість та переваги застосування таких модифікацій очевидні для фахівця у даній галузі.

10 Наприклад, така модифікація може включати введення (наприклад, за допомогою ковалентного зв'язування або іншим підходящим способом) однієї або декількох функціональних груп, залишків або молекул у біпаратопний поліпептид відповідно до винаходу, зокрема, однієї або декількох функціональних груп, залишків або молекул, які повідомляють біпаратопному поліпептиду відповідно до винаходу одну або кілька потрібних властивостей або  
15 одну або декілька потрібних функціональних ознак. Приклади таких функціональних груп відомі фахівцям.

Наприклад, така модифікація може включати введення (наприклад, за допомогою ковалентного зв'язування або іншим підходящим способом) однієї або декількох функціональних груп, які збільшують час напівжиття; підвищують розчинність та/або абсорбцію  
20 поліпептиду відповідно до винаходу, знижують імуногенність та/або токсичність поліпептиду відповідно до винаходу; усувають або зменшують які-небудь небажані побічні ефекти поліпептиду відповідно до винаходу, та/або повідомляють інші кращі властивості та/або усувають небажані властивості біпаратопних нанотіл, та/або поліпептидів відповідно до винаходу, або будь-яку комбінацію двох або більше із зазначених вище властивостей. Приклади  
25 таких функціональних груп та способи їх введення відомі фахівцям, і такі приклади можуть, в основному, включати всі функціональні групи, відомі фахівцям, а також функціональні групи та методи, відомі *per se* та застосовувані для модифікації фармацевтичних білків, зокрема, для модифікації антитіл або фрагментів антитіл (включаючи scFv та однодоменні антитіла), де зазначені функціональні групи та методи описані, наприклад, у настанові Remington's  
30 Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980). Такі функціональні групи можуть бути безпосередньо приєднані (наприклад, ковалентно) до біпаратопного поліпептиду відповідно до винаходу, або вони можуть бути приєднані, але необов'язково, за допомогою підходящого лінкеру або спейсеру, як відомо фахівцям.

Інша, звичайно менш краща модифікація містить N-зв'язане або O-зв'язане глікозилювання, звичайно здійснюване в процесі котрансляційної та/або післятрансляційної модифікації залежно  
35 від типу клітини-хазяїна, використовуваної для експресії біпаратопного нанотіла або поліпептиду відповідно до винаходу.

Інша модифікація може містити введення однієї або декількох детектуємих міток, або інших сигнал-генеруючих груп або молекул, залежно від мети застосування міченого поліпептиду або  
40 нанотіла. Підходящі мітки та способи їх приєднання, використання та детектування відомі фахівцям, та такими мітками є, але не обмежуються ними, флуоресцентні мітки, фосфоресцюючі мітки, хемілюмінесцентні мітки, біоломінесцентні мітки, радіоактивні ізотопи, метали, хелатні комплекси з металами, катіони металів, хромофори та ферменти, наприклад, згадані на сторінці 109 заявки WO 08/020079. Фахівцям у даній галузі відомі й інші підходящі  
45 мітки, і такими мітками є, наприклад, молекули, які можуть бути детектовані за допомогою ЯМР-спектроскопії або резонансної спектроскопії методом електророзпилення.

Такі мічені біпаратопні нанотіла та поліпептиди відповідно до винаходу можуть бути використані, наприклад, для проведення аналізів *in vitro*, *in vivo* або *in situ* (включаючи імуноаналізи, відомі *per se*, такі як ELISA, PIA, EIA та інші "сендвич-аналізи" і т.п.), а також для  
50 діагностики та візуалізації *in vivo* залежно від вибору конкретної мітки.

Як очевидно для фахівця у даній галузі, інша модифікація може включати введення хелатоутворюючої групи, наприклад, для утворення хелатного комплексу з металами або катіонами металів, описаними вище. Підходящими хелатоутворюючими групами є, але не  
55 обмежуються ними, діетилентриамінпентаоцтова кислота (DTPA) або етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA).

Інша модифікація може містити введення функціональної групи, яка являє собою одну частину конкретної зв'язуючої пари, такої як зв'язуюча пара "біотин-(стрепт)авідин". Така функціональна група може бути використана для зв'язування біпаратопного поліпептиду  
60 відповідно до винаходу або нанотіла відповідно до винаходу з іншим білком, поліпептидом або хімічною сполукою, які зв'язуються з іншою половиною зв'язуючої пари, тобто, з утворенням

зв'язуючої пари. Наприклад, біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу може бути кон'юговане з біотином та зв'язане з іншим білком, поліпептидом, сполукою або носієм, кон'югованим з авідіном або зі стрептавідином. Наприклад, таке кон'юговане біпаратопне нанотіло може бути використане як репортер, наприклад, у системі діагностики, у якій

5 детектуємий сигнал-генеруючий агент кон'югований з авідіном або із стрептавідином. Такі зв'язуючі пари можуть бути також використані, наприклад, для зв'язування біпаратопного нанотіла відповідно до винаходу з носієм, включаючи носії, що підходять для їхнього використання у фармацевтиці. Одним з необмежуваних прикладів є ліпосомні препарати, описані Cao і Suresh, *Journal of Drug Targeting*, 8, 4, 257 (2000). Такі зв'язуючі пари можуть бути

10 також використані для приєднання терапевтично активного засобу до нанотіла відповідно до винаходу.

Для застосування у деяких цілях, зокрема, для знищення клітин, експресуючих CXCR 2-мішень, проти якої спрямовані біпаратопні поліпептиди або окремі варіабельні домени біпаратопного імуноглобуліну відповідно до винаходу (наприклад, для лікування раку), або для

15 зниження або уповільнення росту, та/або проліферації таких клітин, біпаратопні поліпептиди відповідно до винаходу можуть бути також приєднані до токсину або до токсичного залишку, або до токсичної частини. Прикладами токсичних частин, сполук або залишків, які можуть бути приєднані до біпаратопного поліпептиду відповідно до винаходу з одержанням, наприклад, цитотоксичної сполуки, є токсичні частини, сполуки або залишки, які відомі фахівцям та описані

20 у попередніх роботах, процитованих вище та/або у докладному описі даної заявки. Одним із прикладів є так звана технологія ADEPT™, описана у WO 03/055527.

Фахівцям відомі й інші можливі хімічні та ферментативні модифікації. Такі модифікації можуть бути також введені у дослідницьких цілях (наприклад, для дослідження взаємозв'язку функції та активності). Їхній опис можна знайти, наприклад, у публікації Lundblad and Bradshaw, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 26, 143-151 (1997).

25

Кращими похідними є такі похідні, які зв'язуються з CXCR2 з афінністю (що звичайно вимірюється та/або що виражається як величина  $K_D$  (фактична або гадана), величина  $K_A$  (фактична або гадана), константа швидкості асоціації  $K_{on}$  та/або константа швидкості дисоціації  $K_{off}$ , або альтернативно, як величина  $IC_{50}$ , також докладно описані у даній заявці), яка визначена

30 у даному описі для біпаратопних нанотіл відповідно до винаходу.

Як було згадано вище, даний винахід також відноситься до білків або поліпептидів, які, по суті, складаються щонайменше з одного біпаратопного поліпептиду відповідно до винаходу або містять зазначений поліпептид. Термін "по суті, складається з" означає, що амінокислотна послідовність поліпептиду відповідно до винаходу або є точно такою ж, як амінокислотна

35 послідовність біпаратопного поліпептиду відповідно до винаходу, або відповідає амінокислотній послідовності такого поліпептиду відповідно до винаходу, яка має обмежене число амінокислотних залишків, а саме, 1-20 амінокислотних залишків, наприклад, 1-10 амінокислотних залишків, а переважно, 1-6 амінокислотних залишків, а саме 1, 2, 3, 4, 5 або 6 амінокислотних залишків, доданих до аміно-кінця, до карбокси-кінця або до аміно-кінця та до карбокси-кінця амінокислотної послідовності біпаратопного поліпептиду.

40

Зазначені амінокислотні залишки можуть змінювати, модифікувати або як-небудь інакше впливати на (біологічні) властивості поліпептиду, а можуть і не мати такої дії, а також вони можуть надавати, а можуть і не надавати додаткових функціональних властивостей. Наприклад, такі амінокислотні залишки:

45

- можуть включати N-кінцевий залишок Met, наприклад, залишок, що утворюється в результаті експресії у гетерологічній клітині-хазяїні або у гетерологічному організмі-хазяїні;

- можуть утворювати сигнальну послідовність або лідерну послідовність, яка забезпечує секрецію біпаратопного поліпептиду із клітини-хазяїна після синтезу. Підходящі секреторні лідерні пептиди відомі фахівцям та більш докладно описані нижче. Звичайно, така лідерна

50 послідовність може бути приєднана до N-кінця біпаратопного поліпептиду;

- можуть утворювати послідовність або сигнал, які дозволяють біпаратопному поліпептиду направлятися до конкретних органів, тканин, клітин або частин або компартментів клітин, та/або проникати, або проходити у них, та/або які дозволяють біпаратопному поліпептиду проникати або переходити через біологічний бар'єр, такий як клітинна мембрана, клітинний шар, такий як шар епітеліальних клітин, пухлина, включаючи солідні пухлини, або гематоенцефалічний бар'єр. Приклади таких амінокислотних послідовностей відомі фахівцям та згадуються у параграфі (с) на сторінці 112 заявки WO 08/020079;

55

- можуть утворювати "мітку", наприклад, амінокислотну послідовність або залишок, які дозволяють здійснювати очищення біпаратопного нанотіла або полегшують таке очищення, наприклад, з використанням способів на основі афінності до зазначеної послідовності або до

60

зазначеного залишку. Потім зазначені послідовності або залишок можуть бути вилучені (наприклад, шляхом хімічного або ферментативного розщеплення) з одержанням послідовності біпаратопного поліпептиду (для цих цілей, мітка може бути, але необов'язково, приєднана до послідовності біпаратопного поліпептиду за допомогою відщеплюваної лінкерної послідовності, або вона може містити відщеплюваний мотив). Деякими кращими, але необмежуваними прикладами таких залишків є полігістидинові залишки, глутатіонові залишки та тус-мітка (див., наприклад, SEQ ID NO:31 у заявці WO 06/12282);

- можуть являти собою один або декілька амінокислотних залишків, які можуть бути функціоналізовані та/або можуть слугувати сайтом приєднання функціональних груп. Підходящі амінокислотні залишки та функціональні групи відомі фахівцям, і такими залишками й групами є, але не обмежуються ними, амінокислотні залишки та функціональні групи, згадані у даному документі при описі похідних біпаратопних поліпептидів або нанотіл відповідно до винаходу.

У іншому аспекті винаходу, біпаратопний поліпептид відповідно до винаходу містить біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу, яке злите щонайменше з одним іншим пептидом або поліпептидом біля аміно-кінця, біля карбокси-кінця або біля аміно-кінця та біля карбокси-кінця, з одержанням злитого білку, що містить зазначене біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу та один або декілька інших пептидів або поліпептидів. Такий злитий поліпептид також називається у даному документі "злитим нанотілом".

Переважно, щоб такий додатковий пептид або поліпептид надавав біпаратопному нанотілу або поліпептиду відповідно до винаходу одну або кілька потрібних властивостей або функціональних ознак.

Наприклад, додатковий пептид або поліпептид може також вводити додатковий сайт зв'язування, де зазначений сайт зв'язування може безпосередньо зв'язуватися з будь-яким потрібним білком, поліпептидом, антигеном, антигенною детермінантою або епітопом (включаючи, але не обмежуючись ними, ті ж самі білки, поліпептиди, антигени, антигенні детермінанти або епітопи, проти яких спрямований біпаратопний поліпептид відповідно до винаходу, або інші білки, поліпептиди, антигени, антигенні детермінанти або епітопи).

Приклади таких пептидів або поліпептидів відомі фахівцям та можуть, по суті, включати всі амінокислотні послідовності, використовувані для одержання злитих пептидів на основі стандартних антитіл та їх фрагментів (включаючи, але не обмежуючись ними, scFv та односторонні антитіла). Їхній опис можна знайти, наприклад, у публікації Holliger and Hudson, *Nature Biotechnology*, 23, 9, 1126-1136 (2005).

Наприклад, такий пептид або поліпептид може являти собою амінокислотну послідовність, яка збільшує час напівжиття; підвищує розчинність або абсорбцію; знижує імуногенність або токсичність; усуває або зменшує небажані побічні ефекти; та/або надає інших кращих властивостей поліпептидам відповідно до винаходу, та/або усуває небажані властивості поліпептидів відповідно до винаходу у порівнянні з поліпептидом відповідно до винаходу *per se*. Деякими необмежуваними прикладами таких пептидів та поліпептидів є сироваткові білки, такі як альбумін сироватки людини (див., наприклад, WO 00/27435) або гаптенів молекули (наприклад, гаптени, розпізнавані антитілами, що присутні у кровотоку, див., наприклад, WO 98/22141).

Зокрема, у літературі було описано, що фрагменти, що зв'язують імуноглобуліни (такі як  $V_H$ -домени) із сироватковим альбуміном або з його фрагментами, можуть бути використані для збільшення часу напівжиття. Їхній опис можна знайти у WO 00/27435 і WO 01/077137. Відповідно до даного винаходу, біпаратопні поліпептиди, а переважно, біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу зв'язується із сироватковим альбуміном (або з його підходящим фрагментом) або безпосередньо, або за допомогою підходящого лінкеру, зокрема, підходящого пептидного лінкеру, у результаті чого поліпептид відповідно до винаходу може експресуватися як генетичний гібрид (білок). У одному з конкретних аспектів винаходу, біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу може бути приєднане до фрагменту сироваткового альбуміну, який містить щонайменше домен III сироваткового альбуміну або його частини. Їхній опис можна знайти, наприклад, у заявці WO 07/112940, Ablynx N.V.

Альтернативно, як уже обговорювалося вище, додатковий пептид або поліпептид може вводити додатковий сайт зв'язування або зв'язуючу одиницю, які безпосередньо зв'язуються із сироватковим білком (таким як, наприклад, альбумін сироватки людини або інший сироватковий білок, такий як IgG), що приводить до збільшення часу напівжиття у сироватці. Такими амінокислотними послідовностями є, наприклад, описані нижче нанотіла, а також невеликі пептиди та зв'язуючі білки, описані у заявках WO 91/01743, WO 01/45746 і WO 02/076489, та dAb, описані у заявках WO 03/002609 та WO 04/003019. Їхній опис можна також знайти у публікації Harmsen et al., *Vaccine*, 23 (41); 4926-42, 2005, а також у EP 0368684, у заявках WO



08/028977, WO 08/043821, WO 08/043822, Ablynx N.V. та у попередній заявці США, Ablynx N.V., озаглавленій "Peptides capable of binding to serum proteins" та поданій 5 грудня 2006 року (див. також PCT/EP2007/063348).

Такі пептиди або поліпептиди можуть бути, зокрема, спрямовані проти сироваткового альбуміну (а більш конкретно, проти альбуміну сироватки людини) та/або проти IgG (а більш конкретно, проти IgG людини). Наприклад, такими амінокислотними послідовностями можуть бути амінокислотні послідовності, спрямовані безпосередньо проти сироваткового альбуміну (людини), та амінокислотні послідовності, які можуть зв'язуватися з амінокислотними залишками на сироватковому альбуміні (людини), та які не беруть участь у зв'язуванні сироваткового альбуміну з FcRn (див., наприклад, WO 06/0122787), та/або амінокислотні послідовності, які здатні зв'язуватися з амінокислотними залишками на сироватковому альбуміні, та які не утворюють частину домену III сироваткового альбуміну (див., наприклад, WO 06/0122787); амінокислотні послідовності, які мають збільшений час напівжиття або можуть повідомляти збільшений час напівжиття (див., наприклад, WO 08/028977, Ablynx N.V.); амінокислотні послідовності, які спрямовані проти альбуміну сироватки людини, та які перехресно реагують із сироватковим альбуміном, що походить від ссавців щонайменше одного виду, зокрема, від приматів щонайменше одного виду (таких як, але не обмежуваних ними, мавпи, що належать до роду *Macaca* (такі як, зокрема, собакоподібні мавпи (*Macaca fascicularis*) та/або макак-резус (*Macaca mulatta*)) та павіанів (*Papio ursinus*)), див. також WO 08/028977; амінокислотні послідовності, які можуть зв'язуватися із сироватковим альбуміном незалежно від pH (див., наприклад, заявку WO 08/043821, Ablynx N.V., озаглавлену "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") та/або амінокислотні послідовності, які зв'язуються залежно від певних умов (див., наприклад, заявку 08/043822, Ablynx N.V., озаглавлену "Amino acid sequences that bind to a desired molecule in a conditional manner").

Відповідно до іншого аспекту винаходу, одна або декілька додаткових пептидних, поліпептидних або білкових послідовностей можуть містити одну або кілька частин, один, або кілька фрагментів або один або декілька доменів стандартних 4-ланцюгових антитіл (зокрема, антитіл людини) та/або антитіл з важким ланцюгом. Наприклад, біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу може зв'язуватися зі стандартним (переважно, людини)  $V_H$ - або  $V_L$ -доменом або із природним або синтетичним аналогом  $V_H$ - або  $V_L$ -домену, необов'язково, за допомогою лінкерної послідовності (включаючи, але не обмежуючись ними, інші (одно)доменні антитіла, такі як dAb, описані Ward et al.), хоча таке антитіло звичайне є менш кращим.

Біпаратопний поліпептид або біпаратопне нанотіло може також зв'язуватися з одним або декількома (переважно, людини)  $C_H1$ -,  $C_H2$ - та/або  $C_H3$ -доменами, необов'язково, за допомогою лінкерної послідовності. Наприклад, біпаратопне нанотіло, пов'язане з підходящим  $C_H1$ -доменом, може бути, наприклад, використане разом з підходящими легкими ланцюгами для одержання фрагментів антитіла/структур, які аналогічні стандартним Fab-фрагментам або  $F(ab')_2$ -фрагментам, але у яких один або (у випадку  $F(ab')_2$ -фрагменту) один або обидва стандартних  $V_H$ -домени були замінені біпаратопним нанотілом відповідно до винаходу. Крім того, два біпаратопних поліпептиди можуть бути пов'язані з  $C_H3$ -доменом (необов'язково, за допомогою лінкеру) з одержанням конструкції, що має збільшений час напівжиття *in vivo*.

Відповідно до одного з конкретних аспектів поліпептиду відповідно до винаходу, один або декілька біпаратопних поліпептидів або одне або декілька біпаратопних нанотіл відповідно до винаходу можуть бути зв'язані (необов'язково, за допомогою підходящого лінкеру або шарнірної області) з одним або декількома константними доменами (наприклад, з 2 або 3 константними доменами, які можуть бути використані як частина Fc-фрагменту/ для утворення Fc-фрагменту), з Fc-частиною та/або з однією або декількома частинами, фрагментами або доменами антитіла, які надають поліпептиду відповідно до винаходу одну або декілька ефektorних функцій, та/або які можуть надавати цьому поліпептиду здатність зв'язуватися з одним або декількома Fc-рецепторами. Наприклад, один або кілька додаткових пептидів або поліпептидів, використовуваних у цих цілях, але не обмежуючись ними, можуть містити один або декілька  $C_H2$ - та/або  $C_H3$ -доменів антитіла, наприклад, антитіла з важким ланцюгом (як описано у даній заявці), а більш переважно, стандартного 4-ланцюгового антитіла людини; та/або вони можуть утворювати (частину) Fc-області, наприклад, що походить від IgG (наприклад, від IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4), від IgE або від іншого Ig людини, такого як IgA, IgD або IgM. Наприклад, у WO 94/04678 описані антитіла з важким ланцюгом, що містять  $V_{HH}$ -домен верблюда або його гуманізовану похідну (тобто, нанотіло), у яких верблужі  $C_H2$ - та/або  $C_H3$ -домени були замінені  $C_H2$ - та  $C_H3$ -доменами людини з утворенням імуноглобуліну, який складається з 2 важких ланцюгів, кожен з яких містить нанотіло та  $C_H2$ - або  $C_H3$ -домени людини (але не  $C_H1$ -домен), де

5 зазначений імуноглобулін має ефекторну функцію, що надається  $C_H2$ - або  $C_H3$ -доменами, та де зазначений імуноглобулін може функціонувати за відсутності яких-небудь легких ланцюгів. Інші амінокислотні послідовності, які можуть бути відповідним чином пов'язані з нанотілами відповідно до винаходу для повідомлення їм ефекторної функції, відомі фахівцям та можуть бути обрані відповідно до їхніх бажаних ефекторних функцій. Опис цих послідовностей можна знайти, наприклад, у WO 04/058820, WO 99/42077, WO 02/056910 і WO 05/017148, а також у публікаціях Holliger і Hudson, див. вище. Зв'язування поліпептиду, наприклад, нанотіла відповідно до винаходу з Fc-частиною може також приводити до збільшення часу напівжиття на відміну від відповідного поліпептиду відповідно до винаходу. Для деяких цілей, використання Fc-частини та/або константних доменів (тобто,  $C_H2$ - та/або  $C_H3$ -доменів), які надають збільшений час напівжиття, але не мають якої-небудь біологічно значимої ефекторної функції, може також виявитися бажаним або навіть кращим. Інші підходящі конструкції, що містять один або декілька біпаратопних поліпептидів, таких як нанотіла, та один або декілька константних доменів зі збільшеним часом напівжиття *in vivo*, відомі фахівцям та можуть, наприклад, включати два нанотіла, пов'язаних з  $C_H3$ -доменом, необов'язково, за допомогою лінкерної послідовності. Як правило, будь-який злитий білок або будь-які похідні зі збільшеним часом напівжиття, переважно, мають молекулярну масу більш ніж 50 кД, тобто, граничну величину для абсорбції в нирках.

20 У іншому конкретному, але не обмежуючому аспекті винаходу, для одержання поліпептиду відповідно до винаходу, одна або декілька амінокислотних послідовностей відповідно до винаходу можуть бути приєднані (необов'язково, за допомогою підходящого лінкеру або підходящої шарнірної області) до природних, синтетичних або напівсинтетичних константних доменів (або їх аналогів, варіантів, мутантів, частин або фрагментів), які мають знижену тенденцію (або по суті, не виявляють такої тенденції) до самоскладання у димери (тобто, у порівнянні з константними доменами, які звичайно присутні у стандартних 4-ланцюгових антитілах). Так мономерні (тобто, що не самоасоціюються) варіанти Fc-ланцюгу або їх фрагменти відомі спеціалістам у даній області. Так, наприклад, у публікації Helm et al., J. Biol. Chem. 1996 271 7494, описані варіанти мономерного Fc-ланцюгу, які можуть бути використані у поліпептидних ланцюгах відповідно до винаходу.

30 Крім того, такі варіанти мономерного Fc-ланцюгу є кращими, оскільки вони зберігають здатність зв'язуватися з комплементом або з релевантним(и) Fc-рецептором(ами) (залежно від Fc-частини, від якої вони походять) та/або оскільки вони зберігають деякі або всі ефекторні функції Fc-частини, від якої вони походять (або на зниженому рівні, але все-таки достатньому для здійснення потрібних цілей). Альтернативно, у такому поліпептидному ланцюзі відповідно до винаходу, мономерний Fc-ланцюг може бути також використаний для надання поліпептидному ланцюгу збільшеного часу напівжиття, де зазначений мономерний Fc-ланцюг може також не мати або майже не мати ефекторних функцій.

40 Додаткові пептиди або поліпептиди можуть також утворювати сигнальну послідовність або лідерну послідовність, яка направляє секрецію біпаратопного нанотіла або поліпептиду відповідно до винаходу із клітини-хазяїна після його синтезу (наприклад, з утворенням пре-, про- або препо-форми поліпептиду відповідно до винаходу залежно від типу клітини-хазяїна, використовуваної для експресії поліпептиду відповідно до винаходу).

45 Додатковий пептид або поліпептид може також утворювати послідовність або сигнал, які дозволяють біпаратопному нанотілу або поліпептиду відповідно до винаходу направлятися до конкретних органів, тканин, клітин або частин, або компартментів клітин, та/або проникати або проходити у них, та/або які дозволяють біпаратопному нанотілу або поліпептиду відповідно до винаходу проникати або переходити через біологічний бар'єр, такий як клітинна мембрана, клітинний шар, такий як шар епітеліальних клітин, пухлина, включаючи солідні пухлини, або через гематоенцефалічний бар'єр. Підходящі приклади таких амінокислотних послідовностей відомі фахівцям, і такими амінокислотними послідовностями є, наприклад, але не обмежуються ними, амінокислотні послідовності, що згадуються на сторінці 118 заявки WO 08/020079. Для застосування у деяких цілях, зокрема, для знищення клітин, що експресують CXCR2-мішень, проти якої спрямовані біпаратопні поліпептиди відповідно до винаходу (наприклад, для лікування раку), або для зниження або вповільнення росту та/або проліферації таких клітин, біпаратопні поліпептиди відповідно до винаходу можуть бути також приєднані до (цито)токсичного білку або поліпептиду. Приклади таких токсичних білків та поліпептидів, які можуть бути приєднані до нанотіла відповідно до винаходу з одержанням, наприклад, цитотоксичного поліпептиду відповідно до винаходу, відомі фахівцям та описані у попередніх роботах, що цитуються вище та/або у докладному описі даної заявки. Одним із прикладів є так звана технологія ADEPT™, описана у WO 03/055527.

Відповідно до одного необов'язкового та необмежуючого аспекту винаходу, зазначені один або декілька додаткових пептидів, або поліпептидів містять щонайменше одне додаткове нанотіло, а тому являють собою поліпептид відповідно до винаходу, який містить щонайменше три, наприклад, чотири, п'ять або більш нанотіл, де зазначені нанотіла можуть бути зв'язані, але

необов'язково, за допомогою однієї або декількох лінкерних послідовностей (як визначено у даній заявці).

І нарешті, у обсяг даного винаходу входять біпаратопні поліпептиди відповідно до винаходу, які можуть містити два або більше нанотіл, та один або декілька додаткових пептидів або поліпептидів (як згадується у даній заявці).

Опис полівалентних та мультиспецифічних поліпептидів, що містять два або більше  $V_{HH}$ -доменів, та їхні одержання можна також знайти у публікаціях Conrath et al., J. Biol. Chem., Vol. 276, 10. 7346-7350, 2001; Muyltermans, Reviews in Molecular Biotechnology 74 (2001), 277-302; а також, наприклад, у WO 96/34103 та WO 99/23221. Деякі інші приклади деяких специфічних, мультиспецифічних та/або полівалентних поліпептидів відповідно до винаходу можна знайти у

заявках Ablynx N.V., що згадуються у даній заявці.

Один із кращих прикладів мультиспецифічного поліпептиду відповідно до винаходу включає щонайменше одне біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу та щонайменше одне нанотіло, яке повідомляє збільшений час напівжиття. Такими нанотілами можуть бути, наприклад, нанотіла, які спрямовані проти сироваткового білку, зокрема, сироваткового білку людини, такого як альбумін сироватки людини, білок, що зв'язується з тироксином, трансферин (людини), фібриноген, імуноглобулін, такий як IgG, IgE або IgM, або проти одного із сироваткових білків, перерахованих у WO 04/003019. Серед цих нанотіл, нанотіла, які можуть зв'язуватися із сироватковим альбуміном (зокрема, з альбуміном сироватки людини) або з IgG (зокрема, з IgG людини, див., наприклад, опис нанотіла  $V_{H-1}$  у публікації Muyltermans, див. вище), є особливо кращими (хоча, наприклад, для проведення експериментів на мишах або приматах можуть бути використані нанотіла, які спрямовані проти альбуміну сироватки миші (MSA) або сироваткового альбуміну від зазначеного примата, відповідно, або які перехресно зв'язуються із зазначеними альбумінами. Однак, для застосування у фармацевтиці, звичайно кращими є нанотіла, спрямовані проти альбуміну сироватки людини або проти IgG людини).

Нанотілами, які надають збільшений час напівжиття, і які можуть бути використані у поліпептидах відповідно до винаходу, є нанотіла, спрямовані проти сироваткового альбуміну, де зазначені нанотіла описані у WO 04/041865, WO 06/122787 та у інших патентних заявках, Ablynx N.V., таких як патентні заявки, зазначені вище.

Наприклад, деякими кращими нанотілами, які надають збільшений час напівжиття, та які можуть бути використані у даній заявці, є нанотіла, які можуть зв'язуватися з амінокислотними залишками на сироватковому альбуміні (людини), та які не беруть участі у зв'язуванні сироваткового альбуміну з FcRn (див., наприклад, WO 06/0122787); нанотіла, які здатні зв'язуватися з амінокислотними залишками на сироватковому альбуміні, та які не утворюють частину домену III сироваткового альбуміну (див., наприклад, WO 06/0122787); нанотіла, які мають збільшений час напівжиття або можуть надавати збільшений час напівжиття (див., наприклад, заявку, що згадується у даному документі, WO 08/028977, Ablynx N.V.); нанотіла, які спрямовані проти альбуміну сироватки людини, та які перехресно реагують із сироватковим альбуміном, що походять від ссавців щонайменше одного виду, зокрема, від приматів щонайменше одного виду (таких як, але не обмежуваних ними, мавпи, що належать до роду *Macaca* (такі як, зокрема, собакоподібні мавпи (*Macaca fascicularis*) та/або макак-резус (*Macaca mulatta*)) та павіанів (*Papio ursinus*)) (див. наприклад, WO 08/028977, Ablynx N.V.); нанотіла, які можуть зв'язуватися із сироватковим альбуміном незалежно від pH (див., наприклад, заявку WO 2008/043821, Ablynx N.V., що згадується у даній заявці) та/або нанотіла, які зв'язуються залежно від певних умов (див., наприклад, заявку WO 08/043822, Ablynx N.V.).

Деякими особливо кращими нанотілами, які повідомляють збільшений час напівжиття, та які можуть бути використані у поліпептидах відповідно до винаходу, є нанотіла ALB-1 - ALB-10, описані у WO 06/122787 (див. таблиці II та III), з яких особливо кращим є ALB-8 (SEQ ID NO:62 у WO 06/122787).

Відповідно до конкретного аспекту винаходу, поліпептиди відповідно до винаходу містять, крім двох або більше нанотіл, щонайменше одне нанотіло, спрямоване проти альбуміну сироватки людини.

Іншими додатковими пептидами або поліпептидами, які можуть бути додані до біпаратопних поліпептидів відповідно до винаходу або які можуть бути приєднані до біпаратопних поліпептидів відповідно до винаходу або пов'язані із цими поліпептидами, є полімери, що складаються із проліну, аланіну та серину (послідовності PAS). Послідовності PAS можуть

складатися з 200-600 залишків та сприяють різкому збільшенню гідродинамічного обсягу, що приводить до збільшення часу напівжиття у плазмі. Час напівжиття у плазмі біпаратопних поліпептидів відповідно до винаходу може бути також збільшений шляхом злиття з поліпептидом, що складається із 864 амінокислот та позначається XTEN, як описано Schellenberger et al., (2009), Nature Biotechnology 27, No 12, p1186-1190.

Як правило, будь-які поліпептиди відповідно до винаходу зі збільшеним часом напівжиття, які містять одне або декілька біпаратопних нанотіл відповідно до винаходу, та будь-які похідні біпаратопних нанотіл відповідно до винаходу або зазначених поліпептидів зі збільшеним часом напівжиття, переважно, мають час напівжиття, який щонайменше у 1,5 рази, переважно, щонайменше у 2 рази, а саме, щонайменше у 5 разів, наприклад, щонайменше у 10 разів або більше, ніж у 20 разів перевищує час напівжиття відповідного нанотіла відповідно до винаходу *per se*. Наприклад, така похідна або поліпептиди зі збільшеним часом напівжиття мають час напівжиття, який щонайменше більше, ніж на 1 годину, переважно, більше, ніж на 2 години, більш переважно, більше, ніж на 6 годин, а саме більше, ніж на 12 годин або навіть більше, ніж на 24, 48 або 72 години перевищує час напівжиття відповідного нанотіла відповідно до винаходу *per se*.

У кращому, але необмежуючому аспекті винаходу, такі похідні або поліпептиди можуть мати час напівжиття у сироватці людини, що становить щонайменше приблизно 12 годин, переважно, щонайменше 24 години, більш переважно, щонайменше 48 годин, а ще більш переважно, щонайменше 72 години або більше. Наприклад, такі похідні або поліпептиди можуть мати час напівжиття, що становить щонайменше 5 днів (а саме, приблизно 5-10 днів), переважно, щонайменше 9 днів (а саме, приблизно 9-14 днів), більш переважно, щонайменше приблизно 10 днів (а саме, приблизно 10-15 днів), або щонайменше приблизно 11 днів (а саме, приблизно 11-16 днів), більш переважно, щонайменше приблизно 12 днів (а саме, приблизно 12-18 днів або більше), або більше, ніж 14 днів (а саме, приблизно 14-19 днів).

Інший кращий, але необмежуючий приклад мультиспецифічного поліпептиду відповідно до винаходу містить щонайменше одне біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу та щонайменше одне нанотіло, яке спрямовує поліпептид відповідно до винаходу до конкретних органів, тканин, клітин або частин, або компартментів клітин, та/або дозволяє такому поліпептиду відповідно до винаходу проникати або проходити у них, та/або які дозволяють нанотілу проникати або проходити через біологічний бар'єр, такий як клітинна мембрана, клітинний шар, такий як шар епітеліальних клітин, пухлина, включаючи солідні пухлини, або через гематоенцефалічний бар'єр. Прикладами таких нанотіл є нанотіла, які спрямовані на специфічні білки клітинної поверхні, маркери або епітопи потрібних органів, тканин або клітин (наприклад, маркери клітинної поверхні, пов'язані з пухлинними клітинами), та фрагменти однодоменних антитіл, які націлені на головний мозок та описані у WO 02/057445 і WO 06/040153, з яких кращими прикладами є FC44 (SEQ ID NO:189 у заявці WO 06/040153) і FC5 (SEQ ID NO:190 у заявці WO 06/040154).

У поліпептидах відповідно до винаходу, два або більше нанотіл та один, або декілька поліпептидів можуть бути безпосередньо зв'язані один з одним (наприклад, як описано у WO 99/23221), та/або вони можуть бути зв'язані один з одним за допомогою одного або декількох підходящих спейсерів або лінкерів, або будь-яких їхніх комбінацій.

Відповідно до одного з аспектів винаходу, поліпептид відповідно до винаходу присутній, по суті, у виділеній формі, як визначено у даній заявці.

Амінокислотні послідовності, біпаратопні нанотіла, поліпептиди та нуклеїнові кислоти відповідно до винаходу можуть бути отримані відомим методом *per se*, що буде очевидним для фахівців з докладного опису даної заявки. Наприклад, біпаратопні нанотіла та поліпептиди відповідно до винаходу можуть бути отримані будь-яким відомим методом *per se*, застосовуванням для одержання антитіл, зокрема, для одержання фрагментів антитіл (включаючи, але не обмежуючись ними, (одно)доменні антитіла та scFv-фрагменти). Деякими кращими, але необмежуваними методами одержання амінокислотних послідовностей, нанотіл, поліпептидів та нуклеїнових кислот є методи та технології, описані у даній заявці.

Як очевидно для фахівця у даній галузі, один особливо підходящий спосіб одержання біпаратопного нанотіла та/або поліпептиду відповідно до винаходу, по суті, включає стадії:

i) експресії, у підходящій клітині-хазяїні або у підходящому організмі-хазяїні (що також називаються у даному документі "хазяїном відповідно до винаходу") або у іншій підходящій експресійній системі, нуклеїнової кислоти, яка кодує зазначене біпаратопне нанотіло або зазначений поліпептид відповідно до винаходу (що також називають у даному документі "нуклеїновою кислотою відповідно до винаходу"), та необов'язково:

ii) виділення та/або очищення отриманого у такий спосіб зазначеного біпаратопного

нанотіла або поліпептиду відповідно до винаходу.

Зокрема, спосіб може включати стадії:

i) культивування та/або підтримки хазяїна відповідно до винаходу в умовах, при яких зазначений хазяїн відповідно до винаходу буде експресувати та/або продукувати щонайменше одне біпаратопне нанотіло та/або щонайменше один поліпептид відповідно до винаходу, та необов'язково:

ii) виділення та/або очищення отриманого у такий спосіб біпаратопного нанотіла або поліпептиду відповідно до винаходу.

У іншому аспекті даний винахід відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид відповідно до винаходу (або його підходящий фрагмент). Така нуклеїнова кислота також називається у даному документі "нуклеїною кислотою відповідно до винаходу" та може мати форму генетичної конструкції, більш докладно описаної нижче.

У своїх кращих варіантах здійснення даний винахід відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, що кодує амінокислотну послідовність, яка вибрана із групи амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:25-43, 90 та SEQ ID NO:213-219 та відноситься до конкретних специфічних нанотіл, представлених у таблицях 9 та 32. Альтернативно, молекули нуклеїнової кислоти відповідно до винаходу включають молекули нуклеїнової кислоти, що кодують конструкції полівалентних та біпаратопних нанотіл SEQ ID NO:44-69. Крім того, молекули нуклеїнової кислоти відповідно до винаходу містять молекули з послідовностями нуклеїнової кислоти SEQ ID NO:192-211, що відносяться до нанотіл, ідентифікованих у таблиці 18.

Нуклеїнова кислота відповідно до винаходу може мати форму одноланцюгової або дволанцюгової ДНК, або РНК, переважно, дволанцюгової ДНК. Наприклад, нуклеотидними послідовностями відповідно до винаходу можуть бути геномна ДНК, кДНК або синтетична ДНК (така як ДНК із частотою зустрічальності кодонів, яка була конкретно адаптована для експресії у розглянутій клітині-хазяїні або у організмі-хазяїні).

Відповідно до одного з аспектів винаходу, нуклеїнова кислота відповідно до винаходу присутня, по суті, у виділеній формі, як визначено у даній заявці.

Нуклеїнова кислота відповідно до винаходу може також мати форму вектору, такого як плазміда, косміда або YAC, або вона може бути присутньою у зазначеному векторі та/або вона може бути частиною такого вектору, та в цьому випадку, нуклеїнова кислота може бути присутньою, по суті, у виділеній формі.

Нуклеїнові кислоти відповідно до винаходу можуть бути отримані або продуковані способом, відомим per se, виходячи з наявної у даному документі інформації про амінокислотні послідовності поліпептидів відповідно до винаходу, та/або вони можуть бути виділені з підходящого природного джерела. Для одержання аналогів, нуклеотидні послідовності, що кодують природні  $V_{HH}$ -домени, можуть бути, наприклад, піддані сайт-спрямованому мутагенезу з метою конструювання нуклеїнової кислоти відповідно до винаходу, що кодує зазначений аналог. Крім того, як очевидно для фахівця у даній галузі, для одержання нуклеїнової кислоти відповідно до винаходу, декілька нуклеотидних послідовностей, таких як щонайменше одна нуклеотидна послідовність, що кодує поліпептид відповідно до винаходу, та, наприклад, нуклеїнові кислоти, що кодують один або декілька лінкерів, можуть бути приєднані одна до іншої відповідним чином.

Способи одержання нуклеїнових кислот відповідно до винаходу відомі фахівцям та можуть включати, наприклад, але не обмежуються ними, автоматизований синтез ДНК; сайт-спрямований мутагенез; об'єднання двох або більше природних та/або синтетичних послідовностей (або їх двох або більше частин); введення мутацій, що сприяють експресії усіченого продукту експресії; введення одного або декількох рестрикційних сайтів (наприклад, для створення кластерів та/або областей, які можуть бути легко гідролізовані та/або ліговані під дією підходящих рестрикуючих ферментів) та/або введення мутацій за допомогою ПЛР-реакції з використанням одного або більше "невідповідних" праймерів з використанням, наприклад, послідовності природного CXCR2 у якості матриці. Ці та інші методи відомі фахівцям та описані у стандартних настановах, таких як настанови Sambrook et al. та Ausubel et al., згадані вище, а також у поданих нижче прикладах.

Нуклеїнова кислота відповідно до винаходу може також мати форму генетичної конструкції, може бути присутньою у генетичній конструкції та/або може бути частиною генетичної конструкції. Такі генетичні конструкції звичайно містять щонайменше одну нуклеїнову кислоту відповідно до винаходу, яка приєднана, але необов'язково, до одного або декількох елементів генетичної конструкції, відомим per se, таких як, наприклад, один або декілька підходящих регуляторних елементів (таких як підходящий(і) промотор(и), енхансер(и), термінатор(и) тощо), та до інших елементів описаних у даному документі генетичних конструкцій. Такі генетичні

конструкції, що містять щонайменше одну нуклеїнову кислоту відповідно до винаходу, називаються у даному документі "генетичними конструкціями відповідно до винаходу".

Генетичними конструкціями відповідно до винаходу можуть бути ДНК або РНК, переважно, дволанцюгова ДНК. Генетичні конструкції відповідно до винаходу можуть також бути присутніми у формі, що підходить для трансформації розглянутої клітини-хазяїна або розглянутого організму-хазяїна; у формі, що підходить для інтеграції у геномну ДНК розглянутої клітини-хазяїна або у формі, що підходить для незалежної реплікації, збереження та/або спадкування у розглянутому організмі-хазяїні. Так, наприклад, генетичні конструкції відповідно до винаходу можуть мати форму вектору, такого як, наприклад, плазміда, косміда, YAC, вірусний вектор або транспозон. Зокрема, зазначеним вектором може бути вектор експресії, тобто, вектор, який стимулює експресію *in vitro* та/або *in vivo* (наприклад, у підходящій клітині-хазяїні, у підходящому організмі-хазяїні та/або у підходящій експресійній системі).

У кращому, але необмежуючому аспекті винаходу, генетична конструкція відповідно до винаходу містить:

i) щонайменше одну нуклеїнову кислоту відповідно до винаходу, функціонально приєднану ii) до одного або декількох регуляторних елементів, таких як промотор та, необов'язково, до підходящого термінатору; а також, але необов'язково:

iii) до одного або декількох інших елементів генетичних конструкцій, відомих *per se*;

де терміни "функціонально приєднаний" та "функціонально зв'язаний" мають значення, наведені на сторінках 131-134 заявки WO 08/020079; терміни "регуляторні елементи", "промотор", "термінатор" та "додаткові елементи" описано на сторінках 131-134 заявки WO 08/020079; а генетичні конструкції докладно описано на сторінках 131-134 заявки WO 08/020079.

Нуклеїнові кислоти відповідно до винаходу та/або генетичні конструкції відповідно до винаходу можуть бути використані для трансформації клітини-хазяїна або організму-хазяїна, тобто, для експресії та/або одержання біпаратопного нанотіла або поліпептиду відповідно до винаходу. Підходящі хазяї або клітини-хазяї відомі фахівцям, і ними можуть бути, наприклад, будь-які підходящі клітини або клітинні лінії грибів, прокаріотів або еукаріотів, або будь-які підходящі мікроорганізми, такі гриби, прокаріоти або еукаріоти, наприклад, описані на сторінках 134 та 135 заявки WO 08/020079, а також усі інші хазяї або клітини-хазяї, відомі *per se* та використовувані для експресії й одержання антитіл та фрагментів антитіл (включаючи, але не обмежуючись ними, (одно)доменні антитіла та scFv-фрагменти), відомих фахівцям. Їхній опис можна знайти у цитованій вище літературі, а також, наприклад, у заявках WO 94/29457; WO 96/34103; WO 99/42077; у публікаціях Frenken et al., (1998), див. вище; Riechmann and Muyldermans, (1999), див. вище; van der Linden, (2000), див. вище; Thomassen et al., (2002), див. вище; Joosten et al., (2003), див. вище; Joosten et al., (2005), див. вище; і в інших цитованих там роботах.

Біпаратопні нанотіла та поліпептиди відповідно до винаходу можуть бути також введені у одну або декілька клітин, тканин або органів багатоклітинного організму, та можуть бути також експресовані у цих клітинах, тканинах або органах, наприклад, у профілактичних та/або терапевтичних цілях (наприклад, для застосування у генній терапії) як докладно описано на сторінках 135 та 136 заявки WO 08/020079 та у інших роботах, цитованих у WO 08/020079.

Для експресії нанотіл у клітинах, ці нанотіла можуть бути також експресовані у вигляді так званих "інтраантитіл", описаних, наприклад, у WO 94/02610, WO 95/22618 і US-A-7004940; WO 03/014960; у публікації Cattaneo, A. & Biocca, S. (1997) *Intracellular Antibodies: Development and Applications*. Landes and Springer-Verlag; та у публікації Kontermann, *Methods* 34, (2004), 163-170.

Біпаратопні нанотіла та поліпептиди відповідно до винаходу можуть також, наприклад, продукуватися у молоці трансгенних ссавців, наприклад, у молоці кроликів, корів, кіз або овець (опис загальних методів введення трансгенів ссавцем можна знайти, наприклад, у US-A-6741957, US-A-6304489 та US-A-6849992), у рослинах або у частинах рослин, включаючи, але не обмежуючись ними, листи, квіти, плоди, насіння, коріння або бульби (наприклад, тютюну, кукурудзи, сої або люцерни), або, наприклад, у лялечках шовкопряда *Bombix mori*.

Крім того, біпаратопні нанотіла та поліпептиди відповідно до винаходу можуть також експресуватися та/або продукуватися у безкліткових експресійних системах, та підходящі приклади таких систем відомі фахівцям у даній області. Деякими кращими, але не обмежуваними прикладами експресії є експресія в зернах пшениці, у лізатах кролячих ретикулоцитів або у системі *E.coli* Zubay.

Як згадувалося вище, одна з переваг використання біпаратопних поліпептидів та нанотіл полягає в тому, що поліпептиди, отримані на їх основі, можуть продукуватися за допомогою експресії у підходящій бактеріальній системі, де підходящі бактеріальні експресійні системи,

вектори, клітини-хазяї, регуляторні елементи та т.п. будуть очевидні для фахівця виходячи з опису цитованих вище робіт. Однак, слід зазначити, що даний винахід, у його самому широкому сенсі, не обмежується експресією у бактеріальних системах.

У даному винаході, переважно, використовується експресійна система (in vivo або in vitro), така як бактеріальна експресійна система, яка дозволяє продукувати поліпептиди відповідно до винаходу у формі, що підходить для їхнього застосування у фармацевтиці, і такі експресійні системи також відомі фахівцям у даній області. Фахівцям у даній області також відомо, що поліпептиди відповідно до винаходу, що підходять для їхнього використання у фармацевтиці, можуть бути отримані методами пептидного синтезу.

У випадку промислового одержання поліпептидів, кращими гетерологічними хазяями, призначеними для (промислового) одержання біпаратопних нанотіл або терапевтичних білків, що містять нанотіла, є штами *E.coli*, *Pichia pastoris*, *S.cerevisiae*, які можуть бути підходящими для великомасштабної експресії/великомасштабного одержання/ великомасштабної ферментації, зокрема, для великомасштабної експресії/великомасштабного одержання/ великомасштабної ферментації у фармацевтичних цілях (тобто, у випадку використання GMP). Підходящі приклади таких штамів відомі фахівцям. Такі штами та системи одержання/експресії можуть також поставлятися такими компаніями, як Biovitrum (Uppsala, Sweden).

Альтернативно, клітинні лінії ссавця, зокрема, клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), можуть бути використані для великомасштабної експресії/великомасштабного одержання/ великомасштабної ферментації, зокрема, великомасштабної експресії/великомасштабного одержання/ великомасштабної ферментації у фармацевтичних цілях. І в цьому випадку, такі системи експресії/одержання також поставляються деякими згаданими вище компаніями.

Вибір конкретної експресійної системи частково залежить від вимог, запропонованих до деяких післятрансляційних модифікацій, а більш конкретно, до глікозилювання. Для одержання рекомбінантного білку, що містить нанотіло, при якому бажано або необхідно глікозилювання, може знадобитися використання відповідних ссавців-хазяїв для експресії, здатних глікозилювати експресований білок. Відповідно до цього, фахівцеві у даній галузі відомо, що профіль глікозилювання (тобто, вид, число та положення залишків, що приєднуються) залежить від клітини або клітинної лінії, використовуваних для експресії. При цьому, переважно, використовувати клітину людини або клітинну лінію людини (тобто, продукуючу білок, який, в основному, має профіль глікозилювання, характерний для людини) або клітинну лінію іншого ссавця, яка може забезпечувати профіль глікозилювання, що є в основному та/або функціонально аналогічним профілю глікозилювання, характерному для людини, або профіль, що щонайменше імітує, глікозилювання, характерний для людини. Як правило, прокаріотичні хазяї, такі як *E. coli*, не мають здатність глікозилювати білки, а при використанні нижчих еукаріотів, таких як дріжджі, профіль глікозилювання буде відрізнятися від профілю глікозилювання, характерного для людини. Проте, слід зазначити, що у даному винаході можуть бути використані всі вищезгадані клітини-хазяї та експресійні системи за умови, що вони будуть продукувати потрібне біпаратопне нанотіло або потрібний біпаратопний поліпептид.

Таким чином, відповідно до одного з аспектів винаходу, біпаратопне нанотіло або біпаратопний поліпептид відповідно до винаходу є глікозильованими. Відповідно до іншого необмежуючого аспекту винаходу, амінокислотна послідовність, нанотіло або поліпептид відповідно до винаходу не є глікозильованими.

Відповідно до одного кращого, але необмежуючого аспекту винаходу, біпаратопне нанотіло або поліпептид відповідно до винаходу продукуються у бактеріальній клітині, зокрема, у бактеріальній клітині, що підходить для великомасштабного виробництва фармацевтичних засобів, а саме, у клітинах вищезгаданих штамів.

Відповідно до іншого кращого, але необмежуючого аспекту винаходу, біпаратопне нанотіло або поліпептид відповідно до винаходу продукуються у дріжджовій клітині, зокрема, у дріжджовій клітині, що підходить для великомасштабного виробництва фармацевтичних засобів, а саме, у клітинах вищезгаданих видів.

Відповідно до ще одного кращого, але необмежуючого аспекту винаходу, біпаратопне нанотіло або поліпептид відповідно до винаходу продукуються у клітині ссавця, зокрема, у клітині людини або у клітині клітинної лінії людини, а більш конкретно, у клітині людини або у клітині клітинної лінії людини, що підходить для великомасштабного виробництва фармацевтичних засобів, а саме, у клітинних лініях, згаданих вище.

Як описано на сторінках 138 і 139 заявки WO 08/020079, якщо експресію у клітині-хазяїні здійснюють для одержання біпаратопних нанотіл та поліпептидів відповідно до винаходу, тоді ці антитіла та поліпептиди або продукують всередині клітин (наприклад, у цитозолі, у періплазмі або у тільцях включення), а потім виділяють із клітин-хазяїв і додатково, але необов'язково,

очищують, або їх продукують у позаклітинному просторі (наприклад, у середовищі для культивування клітин-хазяїв), а потім виділяють із культурального середовища та додатково, але необов'язково, очищують. Таким чином, відповідно до одного необмежуючого аспекту винаходу, біпаратопне нанотіло або поліпептид відповідно до винаходу являють собою

5 амінокислотну послідовність, нанотіло або поліпептид, які були отримані всередині клітин та виділені із клітин-хазяїв, зокрема, з бактеріальних клітин або з тілець включення, присутніх у бактеріальних клітинах. Відповідно до іншого необмежуючого аспекту винаходу, біпаратопне нанотіло або поліпептид відповідно до винаходу являють собою нанотіло або поліпептид, які

10 були отримані у позаклітинному просторі, та які були виділені із середовища для культивування клітин-хазяїв.

Деякі кращі, але необмежуючі приклади промоторів, які можуть бути використані разом із зазначеними клітинами-хазяями, згадуються на сторінках 139 та 140 заявки WO 08/020079.

Деякі кращі, але необмежуючі приклади секреторних послідовностей, які можуть бути використані разом із зазначеними клітинами-хазяями, згадуються на сторінці 140 заявки WO

15 08/020079.

Підходящі методи трансформації хазяїна або клітини-хазяїна відповідно до винаходу відомі фахівцям та можуть бути вибрані залежно від розглянутої клітини-хазяїна/ організму-хазяїна та від використовуваної генетичної конструкції. Опис цих методів приводиться у настановах та у патентних заявках, згаданих вище.

Після трансформації може бути здійснена стадія детектування та добору клітин-хазяїв або організмів-хазяїв, які були успішно трансформовані нуклеотидною послідовністю/ генетичною конструкцією відповідно до винаходу. Такою стадією може бути, наприклад, стадія добору на основі селективного маркера, що присутній у генетичній конструкції відповідно до винаходу, або стадія, що включає детектування поліпептиду відповідно до винаходу, наприклад, з

20 використанням специфічних антитіл.

Трансформовані клітини-хазяї (які можуть бути присутніми у формі стабільної клітинної лінії) або організми-хазяї (які можуть бути присутніми у формі стабільної мутантної лінії або мутантного штаму) входять у додаткові аспекти винаходу.

Переважно, щоб ці клітини-хазяї або організми-хазяї експресували, або (щонайменше) мали здатність експресувати (наприклад, у підходящих умовах) біпаратопне нанотіло або поліпептид відповідно до винаходу (а у випадку організму-хазяїна, щонайменше у одній клітині, у одній ділянці, у одній тканині або у одному органі). Даний винахід також включає додаткові генерації, потомство клітини-хазяїна або нижчого організму-хазяїна та/або потомство вищого організму-хазяїна відповідно до винаходу, яке може бути, наприклад, отримане за допомогою розподілу

30 клітини або шляхом статевого або безстатевого розмноження.

Для одержання/досягнення експресії амінокислотних послідовностей відповідно до винаходу, трансформована клітина-хазяїн або трансформований організм-хазяїн, по суті, можуть підтримуватися та зберігатися та/або можуть бути культивовані в умовах, що сприяють експресії/одержанню (потрібного) біпаратопного нанотіла або поліпептиду відповідно до

40 винаходу. Підходящі умови відомі фахівцям та звичайно залежать від використовуваної клітини-хазяїна/використовуваного організму-хазяїна, а також від регуляторних елементів, під контролем яких відбувається експресія (релевантної) нуклеотидної послідовності відповідно до винаходу. Опис таких умов приводиться у вищезгаданих настановах та у патентних заявках, у параграфах, що відносяться до генетичних конструкцій відповідно до винаходу.

Загалом умови, що підходять, можуть включати використання відповідного середовища, присутність підходящого живильного джерела та/або підходящих мікроелементів, створення підходящої температури та присутність, але необов'язково, підходящого індукуючого фактору або сполуки (наприклад, якщо нуклеотидні послідовності відповідно до винаходу перебувають під контролем індукцйбельного промотору), причому, усі зазначені умови можуть бути вибрані

50 самим фахівцем. У таких умовах, поліпептид відповідно до винаходу може також експресуватися конститутивно, транзйєнтно або тільки у присутності відповідного індуктору.

Для фахівця у даній галузі також очевидно, що біпаратопне нанотіло або поліпептид відповідно до винаходу можуть бути (спочатку) отримані у незрілій формі (як згадувалося вище), а потім вони можуть бути піддані післятрансляційній модифікації залежно від

55 використовуваної клітини-хазяїна/використовуваного організму-хазяїна. І в цьому випадку, біпаратопне нанотіло або біпаратопний поліпептид відповідно до винаходу можуть бути глікозильованими залежно від використовуваної клітини-хазяїна/використовуваного організму-хазяїна.

Біпаратопне нанотіло або біпаратопний поліпептид відповідно до винаходу можуть бути

60 потім виділені із клітини-хазяїна/ організму-хазяїна та/або із середовища для культивування



5 зазначеної клітини-хазяїна або зазначеного організму-хазяїна із застосуванням методів виділення та/або очищення білків, відомих *per se*, таких як (препаративна) хроматографія та/або електрофорез, методи диференціальної преципітації, афінні методи (наприклад, з використанням специфічно відщеплюваної амінокислотної послідовності, пов'язаної з амінокислотою послідовністю, нанотілом або поліпептидом відповідно до винаходу) та/або препаративні імунологічні методи (тобто, з використанням антитіл проти виділюваної амінокислотної послідовності).

10 Загалом, поліпептиди відповідно до винаходу, використовувані у фармацевтиці, можуть бути отримані у вигляді фармацевтичного препарату або фармацевтичних композицій, що містять щонайменше один поліпептид відповідно до винаходу та щонайменше один фармацевтично прийнятний носій, розріджувач, наповнювач та/або ад'ювант, та необов'язково, один або декілька додаткових фармацевтично активних поліпептидів та/або сполук. У необмежуваних прикладах, такий препарат може бути отриманий у формі, що підходить для перорального введення, для парентерального введення (наприклад, внутрішньовенної, внутрішньом'язової або підшкірної ін'єкції, або внутрішньовенного вливання), для місцевого введення, для введення шляхом інгаляції (наприклад, за допомогою аерозольного інгалятора, інгалятора з дозуючим клапаном (MDI) або інсуфлятора (DPI), або шляхом інтраназального введення), у формі шкірного пластиру, імплантату, супозиторіїв, під'язичних препаратів тощо. Такі підходящі форми для введення, які можуть бути твердими, напівтвердими або рідкими залежно від способу введення, а також методи та носії, застосовувані для одержання таких препаратів, відомі фахівцям та більш докладно описані нижче.

20 Таким чином, у іншому своєму аспекті, даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції, яка містить щонайменше один біпаратопний поліпептид відповідно до винаходу, переважно, щонайменше один варіабельний домен одного біпаратопного імуноглобуліну, а більш переважно, щонайменше одне біпаратопне нанотіло відповідно до винаходу, та щонайменше один підходящий носій, розріджувач або наповнювач (тобто, що підходить для використання у фармацевтиці), та, необов'язково, одну або декілька інших активних речовин.

30 Як правило, біпаратопні поліпептиди відповідно до винаходу можуть бути отримані та введені будь-яким підходящим способом, відомих *per se*, наприклад, описаним у цитованих вище заявках (зокрема, у WO 04/041862, WO 04/041863, WO 04/041865, WO 04/041867 і WO 08/020079), а також у стандартних настановах, таких як настанова Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Ed., Mack Publishing Company, USA (1990), Remington, the Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>th</sup> Edition, Lippincott Williams and Wilkins (2005); або у настанові Handbook of Therapeutic Antibodies (S. Dubel, Ed.), Wiley, Weinheim, 2007 (див., наприклад, сторінки 252-255).

35 Так, наприклад, біпаратопні поліпептиди відповідно до винаходу можуть бути отримані та введені будь-яким способом, відомих *per se* та застосовуваним для одержання стандартних антитіл та фрагментів антитіл (включаючи scFv та діатіла), а також інших фармацевтично активних білків. Такі препарати та методи їх одержання відомі фахівцям, і такими препаратами є препарати, що підходять для парентерального введення (наприклад, для внутрішньовенного, внутрішньоочеревинного, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньопросвітнього, внутрішньоартеріального або інтратекального введення) або для місцевого (тобто, крізьшкірного або інтрадермального) введення.

40 Препаратами для парентерального введення можуть бути, наприклад, стерильні розчини, суспензії, дисперсії або емульсії, що підходять для вливання або ін'єкції. Підходящими носіями або розріджувачами для таких препаратів є, наприклад, але не обмежуються ними, носії або розріджувачі, що згадуються на сторінці 143 заявки WO 08/020079. При цьому, кращими є водні розчини або суспензії.

50 Біпаратопні поліпептиди відповідно до винаходу, включаючи окремі варіабельні домени біпаратопного імуноглобуліну та біпаратопного нанотіла, можуть бути також введені методами генотерапії, див., наприклад, патент США № 5399346, який у всій своїй повноті вводиться у даний опис як посилання. Із застосуванням методу доставки за допомогою генотерапії, первинні клітини, трансфіковані геном, що кодуєть біпаратопний поліпептид відповідно до винаходу, можуть бути додатково трансфіковані тканеспецифічними промоторами для доставки гену у конкретні органи, тканини, трансплантати, пухлини або клітини, та ці клітини можуть бути додатково трансфіковані сигнальними та стабілізуючими послідовностями, що стимулюють експресію у субклітинному просторі.

55 Таким чином, біпаратопні поліпептиди, окремі варіабельні домени імуноглобуліну та нанотіла відповідно до винаходу можуть бути введені системно, наприклад, перорально, у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм, таким як інертний розріджувач або добре засвоюваний харчовий носій. Вони можуть бути включені у тверді або м'які желатинові капсули,

спресовані у таблетки або введені пацієнтові безпосередньо з їжею. Для перорального терапевтичного введення, біпаратопні поліпептиди відповідно до винаходу можуть бути об'єднані з одним або декількома наповнювачами та використані у формі таблеток для проковтування, підщічних таблеток для розсмоктування, пастилок, капсул, еліксирів, суспензій, сиропів, облаток тощо. Такі композиції та препарати повинні містити щонайменше 0,1% біпаратопного поліпептиду, одного варіабельного домену імуноглобуліну або нанотіла відповідно до винаходу. Їхній процентний вміст у композиціях та препаратах може варіюватися, але звичайно воно становить приблизно від 2 до 60% по масі зазначеної одиничної дози. Кількість біпаратопного поліпептиду відповідно до винаходу, що присутня у таких терапевтично прийнятних композиціях, повинна бути такою, щоб досягалася його ефективна доза у кровотоці.

Таблетки, пастилки, драже, капсули й т.п. можуть також містити зв'язувальні речовини, наповнювачі, дезінтегруючі засоби, замаслювачі, підсолоджувачі або ароматизатори, наприклад, що згадуються на сторінках 143-144 заявки WO 08/020079. Якщо формою одиничної дози є капсула, тоді вона може містити, крім речовин вищезгаданого типу, рідкий носій, такий як рослинна олія або поліетиленгліколь. Різні інші речовини можуть бути присутніми у вигляді покриттів або для якої-небудь іншої фізичної модифікації твердої форми одиничної дози. Наприклад, таблетки, драже або капсули можуть бути покриті желатином, воском, шелаком або цукром тощо. Сироп або еліксир може містити біпаратопні нанотіла та поліпептиди відповідно до винаходу, сахарозу або фруктозу як підсолоджувач, метилпарабени та пропілпарабени як консерванти, а також барвник та віддушку, таку як вишневий або апельсиновий ароматизатор. Очевидно, що будь-яка речовина, використовувана для одержання будь-якої форми одиничної дози, повинна бути фармацевтично прийнятною та, по суті, нетоксичною при її використанні у певних кількостях. Крім того, біпаратопні нанотіла, окремі варіабельні домени імуноглобуліну та поліпептиди відповідно до винаходу можуть бути введені у препарати та обладнання пролонгованого вивільнення.

Препарати та композиції для перорального введення можуть також мати енттеросолюбільне покриття, що дозволяє конструкціям відповідно до винаходу зберігатися у шлунковому середовищі та проходити у тонкий кишечник. Як правило, препарати та композиції для перорального введення можуть бути відповідним чином приготовлені для доставки у будь-яку потрібну частину шлунково-кишкового тракту. Крім того, для доставки потрібних сполук у шлунково-кишковий тракт можуть бути використані підходящі супозиторії.

Біпаратопні нанотіла, окремі варіабельні домени імуноглобуліну та поліпептиди відповідно до винаходу можуть бути також введені внутрішньовенно або внутрішньочеревинно шляхом вливання або ін'єкції, як докладно описано на сторінках 144 та 145 заявки WO 08/020079.

Для місцевого введення, біпаратопні нанотіла, окремі варіабельні домени імуноглобуліну та поліпептиди відповідно до винаходу можуть бути отримані у чистій формі, тобто, якщо вони є рідинами. Однак, як правило, бажано, щоб вони були нанесені на шкіру у вигляді композицій або препаратів, або у комбінації з дерматологічно прийнятним носієм, який може бути твердим або рідким, як докладно описано на сторінці 145 заявки WO 08/020079.

Загалом, концентрація біпаратопних нанотіл, окремих варіабельних доменів імуноглобуліну та поліпептидів відповідно до винаходу у рідкій композиції, такий як лосьйон, становить приблизно 0,1-25 мас.%, а переважно, приблизно 0,5-10 мас.%. Їхня концентрація у напівтвердій або у твердій композиції, такий як гель або порошок, становить приблизно 0,1-5 мас.%, а переважно, приблизно 0,5-2,5 мас.%.

Кількість біпаратопних нанотіл, окремих варіабельних доменів імуноглобуліну та поліпептидів відповідно до винаходу, необхідна для їхнього використання у терапії, варіюється в залежності не тільки від конкретно обраного біпаратопного нанотіла або поліпептиду, але також і від способу введення, природи стану, що зазнає лікування, від віку та стану здоров'я пацієнта, та, в остаточному підсумку, від призначення лікаря або лікаря-клініциста. Крім того, доза цих біпаратопних нанотіл та поліпептидів відповідно до винаходу варіюється залежно від типів клітин-мішеней, пухлин, тканин, трансплантатів або органів.

Бажаною дозою звичайно є одинична доза або роздрібнені дози, що вводяться через відповідні інтервали, наприклад, два, три, чотири або більше разів на день. Така субодинична доза може бути також розділена, наприклад, на ряд дискретних доз, що вводяться через певні інтервали, таких як багаторазові інгаляції за допомогою інсуфлятора або закапування у очі у вигляді декількох крапель.

Схема введення доз може включати тривале щоденне введення. Термін "тривале введення" означає введення протягом щонайменше двох тижнів, а переважно, кілька тижнів, місяців або років. Необхідні зміни у цій схемі введення можуть бути внесені самим фахівцем у даній області за допомогою лише рутинного експериментування відповідно до наведеного у даному документі

опису. Див. настанову Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. У випадку яких-небудь ускладнень, доза може бути також скоректована лікарем.

У іншому аспекті, даний винахід відноситься до способу лікування захворювань або станів, пов'язаних з порушенням передачі CXCR2-сигналу, шляхом введення ефективної кількості поліпептиду або фармацевтичної композиції відповідно до винаходу, а переважно, окремих варіабельних доменів біпаратопного імунoglobуліну або біпаратопних нанотіл, або композиції, що містить такі домени або нанотіла відповідно до винаходу. Як обговорюється у даній заявці, передача CXCR2-сигналу опосередковує запальну відповідь у легенях пацієнтів, що страждають на хронічну обструктивну хворобу легенів (ХОХЛ), що приводить до деструкції паренхіми легенів. Міграція лейкоцитів, число яких у легенях пацієнтів, що страждають на ХОХЛ, підвищується, опосередковується рецептором CXCR2 на поверхні таких клітин, і цей рецептор CXCR2 зв'язується з декількома лігандами, включаючи IL-8, G $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , E $\alpha$  78 та G $\alpha$  12. Підвищене число нейтрофілів у легенях корелює з важкістю захворювання. Крім того, концентрація G $\alpha$  помітно збільшується у індукованому мокротинні та у бронхіальному лаважі (BAL) пацієнтів з ХОХЛ. Відповідно до цього, передбачається, що пригнічення CXCR2 буде запобігати, усувати або знижувати дистрес-симптоми цього захворювання.

Відповідно до цього, даний винахід відноситься до способів профілактики або лікування ХОХЛ, або загострень ХОХЛ, де зазначені способи включають введення біпаратопного поліпептиду, такого як окремі варіабельні домени біпаратопного імунoglobуліну або біпаратопних нанотіл відповідно до винаходу, зокрема, фармацевтичних композицій, що містять такі домени або нанотіла. Даний винахід також відноситься до застосування зазначеного біпаратопного поліпептиду, включаючи біпаратопні нанотіла та композиції, що містять їх, для лікування ХОХЛ та загострень ХОХЛ.

Як буде очевидно для фахівця, біпаратопні поліпептиди відповідно до винаходу, зокрема, окремі варіабельні домени біпаратопного імунoglobуліну або біпаратопних нанотіл відповідно до винаходу та композиції, що містять їх, можуть бути також використані для лікування інших захворювань, які пов'язані з порушенням функції передачі CXCR2-сигналу, наприклад, інших захворювань дихальних шляхів, таких як кистозний фіброз, астма у важкій формі, загострення астми, алергічна астма, гостре ураження легенів, гострий респіраторний дистрес-синдром, ідіопатичний фіброз легенів, ремоделювання дихальних шляхів, синдром облітеруючого бронхіоліту або бронхопальмонарна дисплазія.

Іншими захворюваннями та станами, для яких можлива профілактика або лікування з використанням біпаратопних поліпептидів відповідно до винаходу, наприклад, окремих варіабельних доменів біпаратопного імунoglobуліну або біпаратопних нанотіл та фармацевтичних композицій, що містять їх, є атеросклероз, гломерулонефрит, запальне захворювання кишечника (хвороба Крона), ангіогенез та захворювання, що характеризуються утворенням нових кровоносних судин, включаючи дегенерацію жовтої плями, діабетичну ретинопатію та діабетичну невропатію, розсіяний склероз, псоріаз, вікову дегенерацію жовтої плями, очну хворобу Бехчета, увеїт, легеневу артеріальну гіпертензію (ЛАГ), включаючи ідіопатичну ЛАГ, спадкову ЛАГ та захворювання, пов'язане з ЛАГ; хронічні запальні захворювання, ревматоїдний артрит, остеоартрит, недрібноклітинну карциному, рак товстої кишки, рак підшлункової залози, рак стравоходу, рак яєчника, рак молочної залози, солідні пухлини та їх метастази, меланому, гепатоцелюлярну карциному або ішемічне реперфузійне ушкодження.

Іншими захворюваннями та станами, для яких можлива профілактика або лікування з використанням біпаратопних поліпептидів відповідно до винаходу, наприклад, окремих варіабельних доменів біпаратопного імунoglobуліну або біпаратопних нанотіл та фармацевтичних композицій, що містять їх, є закупорка судин, викликана гемолітичною трансфузією при серповидно-клітинній анемії, ішемічне/реперфузійне ушкодження, гострий інсульт/інфаркт міокарда, закрита травма голови, посттравматичне запалення та інсулінорезистентний діабет.

Для здійснення вищеописаних способів, біпаратопні нанотіла, окремі варіабельні домени імунoglobуліну та/або поліпептиди відповідно до винаходу, та/або композиції, що містять їх, можуть бути введені будь-яким підходящим способом залежно від конкретно використовуваного фармацевтичного препарату або від конкретно використовуваної фармацевтичної композиції. Таким чином, біпаратопні нанотіла та/або поліпептиди відповідно до винаходу, та/або композиції, що містять їх, можуть бути введені, наприклад, перорально, внутрішньочеревинно (наприклад, внутрішньовенно, підшкірно, внутрішньом'язово або будь-яким іншим способом введення в обхід шлунково-кишкового тракту), інтраназально, трансдермально, місцево, за

допомогою супозиторіїв та шляхом інгаляції залежно від конкретно використовуваних фармацевтичних препаратів або композицій. Як правило, для лікування ХОХЛ, інгаляція не є кращою. Лікар-клініцист може самостійно вибрати підходящий спосіб введення та підходящі фармацевтичні препарати або композиції, використовувані для такого введення, залежно від

5 індивідуальних особливостей пацієнта.

Біпаратопні нанотіла, окремі варіабельні домени імуноглобуліну та/або поліпептиди відповідно до винаходу, та/або композиції, що містять їх, вводять у відповідності зі схемою лікування, яка є найбільш підходящою для профілактики та/або лікування даного захворювання або розладу. Як правило, лікар-клініцист може самостійно вибрати підходящу схему лікування

10 залежно від таких факторів, як конкретне захворювання або розлад, який повинен бути підданий лікуванню, або його профілактика; важкість захворювання, що зазнає лікування, та/або важкість його симптомів; конкретно використовувані біпаратопні нанотіла; окремі варіабельні домени імуноглобуліну або поліпептиди відповідно до винаходу; конкретна схема введення, конкретно використовуваний фармацевтичний препарат або фармацевтична композиція; вік,

15 стать, маса, режим харчування, загальний стан здоров'я пацієнта, а також від інших аналогічних факторів, добре відомих лікарям-клініцистам.

Як правило, для профілактики та/або лікування вищезгаданих захворювань та розладів, зокрема, ХОХЛ доза, що вводиться, буде залежати від активності конкретно використовуваних біпаратопних нанотіл, окремих варіабельних доменів імуноглобуліну або поліпептидів

20 відповідно до винаходу, конкретного способу введення або конкретно використовуваних фармацевтичних препаратів або композицій. Як правило доза, що вводиться, становить від 1 грама до 0,01 мікрограма на кг маси тіла на день, переважно, від 0,1 грама до 0,1 мікрограма на кг маси тіла на день, а саме, приблизно 1, 10, 100 або 1000 мікрограмів на кг маси тіла на день та може бути введена або безперервно (наприклад, шляхом вливання), або у вигляді однієї

25 роздільної дози або декількох роздільних доз протягом доби. Як правило, лікар-клініцист може самостійно визначити підходящу добову дозу залежно від згаданих у даному документі факторів. Також очевидно, що у конкретних випадках, лікар-клініцист може вибрати або змінити ці дози, наприклад, з урахуванням зазначених вище факторів та виходячи з результатів експертної оцінки.

Біпаратопні нанотіла, окремі варіабельні домени імуноглобуліну та поліпептиди відповідно до винаходу можуть бути також використані у комбінації з однією або декількома фармацевтично активними сполуками, або діючими речовинами лікарського засобу, тобто, вони можуть бути введені відповідно до конкретної комбінованої схеми лікування, яка може давати, а

35 може й не давати синергічний ефект. І в цьому випадку, лікар-клініцист може самостійно вибрати зазначені додаткові сполуки або діючі речовини лікарського засобу, а також підходящу комбіновану схему лікування з урахуванням вищезгаданих факторів та виходячи з результатів експертної оцінки.

Наприклад, біпаратопні поліпептиди, такі як біпаратопні нанотіла відповідно до винаходу, можуть бути об'єднані зі стандартними препаратами для лікування ХОХЛ, такими як  $\beta$ -

40 адренергічні бронхорозширюючі засоби короточасної та пролонгованої дії, антихолінергічні засоби (антагоністи мускаринових рецепторів), що вводяться шляхом інгаляції; та кортикостероїди, що вводяться шляхом інгаляції.

Ефективність схеми лікування даного захворювання або розладу, застосовуваної відповідно до даного винаходу, може бути визначена та/або проаналізована будь-яким способом, відомим

45 лікареві-клініцистові per se. У кожному окремому випадку, лікар-клініцист, якщо це необхідно, може також самостійно змінити або модифікувати конкретну схему лікування з метою досягнення бажаного терапевтичного ефекту, а також з метою профілактики, обмеження або зниження небажаних побічних ефектів, та/або з метою досягнення відповідного балансу між бажаним терапевтичним ефектом, з одного боку, і запобіганням, обмеженням або зниженням

50 небажаних побічних ефектів, з іншого боку.

Загалом, курс лікування проводять доти, поки не буде досягнутий бажаний терапевтичний ефект та/або доти, поки бажаний терапевтичний ефект не буде стабільним. І в цьому випадку, такий ефект також може бути визначений лікарем-клініцистом.

Індивідуумом, що піддається лікуванню, може бути будь-яка теплокровна тварина, зокрема, ссавець, а більш конкретно, людина. Як очевидно для фахівця, індивідуумом, що зазнає лікування, зокрема, є пацієнт, що страждає на вищезгадане захворювання та розлади, або пацієнт із ризиком розвитку таких захворювань та розладів.

Даний винахід більш докладний описаний з посиланнями на нижченаведені необмежуючі кращі аспекти, приклади та фігури.

60 Усі цитовані у даному документі публікації вводяться в даний опис як посилання.

Інформація про депонування

- Шість депозитів плазмідної ДНК із вставками, що кодують поліпептиди нанотіл з оптимізованою послідовністю, представлено у таблиці 32 і були депоновані 15 червня 2010 року у Німецькій колекції мікроорганізмів та клітинних культур (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse, 7B, D-38124, Braunschweig, Germany by Novartis Pharma AG, Switzerland). Депозити були зроблені 28 квітня 1997 року відповідно до Будапештського договору про Міжнародне визнання депонування мікроорганізмів для проведення патентної процедури та мають наступні реєстраційні номери:

Конструкція дикого типу	Оптимізована конструкція	Номер депозиту (DSM)
2B2	C100CXCR20059	DSM 23723
97A9	C100CXCR20061	DSM 23724
163E3	C100CXCR20076	DSM 23725
127D1	C100CXCR20079	DSM 23726
163D2	C100CXCR20086	DSM 23727
54B12	C100CXCR20104	DSM 23728

# 1. Клонування CXCR2 людини та собакоподібних мавп

Таблиця 1

<b>CXCR2</b> Людини SEQ ID NO. 1	MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSTLPPFLDAAPEPESEINKYFVVIYALV FLLSLLGNSLVMLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPWAASKVNGWIFGTFL CKVVSLLKEVNFYSGILLACISVDRYLAIVHATRTLTKQRYLVKFICLSIWGLSLLLALP VLLFRRTVYSSNVSPACYEDMGNNANTANWRMLLRILPQSFGFIVPLLMFCYGFTRLRT LFAHMGQKHRAMRVIFAVVLIFLLCWLPYNLVLLADTLMTQVIQETCERRNHIDRA LDATEILGILHSCNPLIYAFIGQKFRHGLLKILAIHGLISKDSLPKDSRPSFVGSSSGHT STTL
<b>Δ1-17</b> <b>CXCR2</b> Людини SEQ ID NO. 2	MEDLSNYSYSTLPPFLDAAPEPESEINKYFVVIYALVFLSLLGNSLVMLVILYS RVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPWAASKVNGWIFGTFLCKVVSLLKEVNFYSGIL LLACISVDRYLAIVHATRTLTKQRYLVKFICLSIWGLSLLLALPVLLFRRTVYSSNVSPA CYEDMGNNANTANWRMLLRILPQSFGFIVPLLMFCYGFTRLRTLFAHMGQKHRAMRV IFAVVLIFLLCWLPYNLVLLADTLMTQVIQETCERRNHIDRALDATEILGILHSCNPLI YAFIGQKFRHGLLKILAIHGLISKDSLPKDSRPSFVGSSSGHTSTTL
<b>CXCR2</b> Собакоподібних мавп SEQ ID NO. 3	MQSFNFEDFWENEDFSNYSYSSDLPPSLPDVAPCRPESEINKYFVVIYALVFLSLL GNSLVMLVILHSRVGRSITDVYLLNLAMADLLFALTLPWAAAKVNGWIFGTFLCKVVS LLKEVNFYSGILLACISVDRYLAIVHATRTLTKQRYLVKFVCLSIWLSLLLALPVLLFR RTVYLTISPVCYEDMGNNATAKWRMVLRLPQTGFILPLLMFCYGFTRLRTLFAHMG QKHRAMRVIFAVVLIFLLCWLPYHLVLLADTLMTRLINETCQRRNNIDQALDATEIL GILHSCNPLIYAFIGQKFRHGLLKILATHGLISKDSLPKDSRPSFVGSSSGHTSTTL

- pcDNA3.1(+) (Invitrogen, V790-20) конструювали для забезпечення високого рівня конститутивної експресії у різних клітинних лініях ссавців. Цей плазмідний вектор містить передранній промотор цитомегаловірусу людини, сигнал поліаденілювання бичачого гормону росту (BGH), маркер відбору на резистентність до неоміцину для клітин ссавців та ген відбору на резистентність до ампіциліну у *E. coli*.

- pVAX1 (Invitrogen, V260-20) являє собою плазмідний вектор, сконструйований для ДНК-вакцин. Цей плазмідний вектор містить передранній промотор цитомегаловірусу людини, сигнал поліаденілювання бичачого гормону росту (BGH) і ген відбору на резистентність до канаміцину у *E. coli*.

Таблиця 2

## Конструкції

Рецептор	Вектор	Конструкція
CXCR2 людини (N-кінцева 3 x HA-мітка)	pcDNA4/TO	Субклонували послідовність ДНК, кодуючу три HA-мітки, потім послідовність CXCR2 людини, а потім (у дужках) сайти рестрикуючих ферментів HindIII та XhoI у 5'- та 3'-кінці, відповідно, у pcDNA4/TO
N-кінцева CCR9-химера CXCR2 людини (N-кінцева 3 x HA-мітка)	pcDNA4/TO	Субклонували послідовність ДНК, кодуючу три HA-мітки, потім перші 39 амінокислот для CCR9 людини, сайт протеази TEV та послідовність CXCR2 людини без N-кінцевих 43 амінокислот, а потім (у дужках) сайти рестрикуючих ферментів HindIII та XhoI у 5'- та 3'-кінці, відповідно, у pcDNA4/TO
$\Delta$ 1-17 CXCR2 людини (N-кінцева 3 x HA-мітка)	pcDNA4/TO	Субклонували послідовність ДНК, кодуючу три HA-мітки, потім послідовність CXCR2 людини без N-кінцевих 17 амінокислот, а потім (у дужках) сайти рестрикуючих ферментів HindIII та XhoI у 5'- та 3'-кінці, відповідно, у pcDNA4/TO
CXCR2 людини	pXoon	кДНК CXCR2 людини (люд. CXCR2) (GENBANK:L.19593) ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням 5'-праймера, що містить EcoRI-сайт розщеплення, та 3'-праймера, що містить NotI-сайт. ПЛР-продукт лігували у плазмідний вектор pXOON
CXCR2 собакоподібних мавп	pcDNA3.1	кДНК CXCR2 собакоподібних мавп ампліфікували з бібліотеки кДНК селезінки/тимуса собакоподібних мавп. Сайти рестрикуючих ферментів NotI та XhoI додавали за допомогою ПЛР та отриманий фрагмент клонували у pcDNA3.1
CXCR2 людини	pVAX1	ПЦР (NheI-NotI) для pXoon_hCXCR2
CXCR2 собакоподібних мавп	pVAX1	NheI-XhoI від pcDNA3.1_cCXCR2
$\Delta$ 1-17 CXCR2 людини	pVAX1	ПЛР (HindIII-XhoI) для pcDNA3.1_3xHA- $\Delta$ 1-17-hCXCR2
$\Delta$ 1-17 CXCR2 людини (N-кінцева 3 x HA-мітка)	pcDNA3.1	HindIII-XhoI від pCR4Blunt-TOPO_3xHA- $\Delta$ 1-17-hCXCR2
CXCR2 людини	pcDNA3.1	NheI-XhoI від pVAX1_hCXCR2

2. Одержання клітинних ліній CHO, CaKi, RBL та HEK293T, експресуючих CXCR2 людини та собакоподібних мавп

5

Таблиця 3

## Клітинні лінії

Хазяїн	Трансформація	Рецептор	Вектор
CHO	Стабільна	$\Delta$ 1-17 CXCR2 людини (N-кінцева 3xHA-мітка)	pcDNA3.1
HEK293T	Короткочасна	CXCR2 собакоподібних мавп	pcDNA3.1
CaKi info для додавання			
/	ДНК-імунізація	CXCR2 людини	pVAX1
/	ДНК-імунізація	CXCR2 собакоподібних мавп	pVAX1
/	ДНК-імунізація	$\Delta$ 1-17 CXCR2 людини	pVAX1
RBL	Стабільна	кДНК CXCR2 людини	pSFFV-Neo
RBL-2H3	Стабільна	кДНК CXCR2 собакоподібних мавп	pcDNA3.1

Таблиця 3

## Клітинні лінії

Хазяїн	Трансформація	Рецептор	Вектор
CHO-Trex	Стабільна	(HA)3-huCXCR2	pcDNA4/TO
CHO-Trex	Стабільна	(HA)3-huCCR9-huCXCR2	pcDNA4/TO
CHO-Trex	Стабільна	(HA)3-huCXCR2ΔN1-17	pcDNA4/TO
L2071	Стабільна	CXCR1 людини	pSFFV-Neo
CEM	Ендогенна	CXCR4	-

## CXCR2 людини Δ1-17 CHO-K1 (N-кінцева 3xHA-мітка)

Клітини CHO-K1 трансфікували плазмідною pcDNA3.1\_3xHA-Δ1-17-hCXCR2 з використанням системи електропорації Амаха (Програма U 23 у розчині Т). Пул трансфікованих клітин витримували під тиском відбору (1000 мкг/мл G418) через два дні після трансфекції. Через вісім днів, популяцію, що містить CXCR2 людини, ідентифікували з використанням FMAT Blue-міченого Gro-α людини. FMAT Blue-мічення Gro-α людини (Biosource, PHC1063) здійснювали з використанням набору з монофункціональним реактивним барвником FMAT Blue відповідно до інструкцій виробників (Applied Biosystems, 4328408). Окремі клітини відбирали у 96-лункових планшетах для культивування клітин з використанням FACSaria (BD Biosciences). Зростаючі клони тестували на експресію Δ1-17 CXCR2 людини на обладнанні FACSarray (BD Biosciences) з використанням FMAT Blue-міченого Gro-α людини. Були відібрані клони CHO-K1 з найкращою експресією (величина MCF = 9000).

## CXCR2 HEK293T собакоподібних мавп

Клітини HEK293T трансфікували плазмідною pcDNA3.1\_cCXCR2 з використанням трансфікуючого реагенту FuGene HD Transfection Reagent (Roche). Через два дні після трансфекції, клітини тестували на експресію CXCR2 собакоподібних мавп (cCXCR2) на обладнанні FACSarray (BD Biosciences) з використанням 50 нМ FMAT Blue-міченого Gro-α. Також були використані клітини з гарною експресією (величина MCF дорівнює приблизно 12000).

## CXCR2 RBL-2H3 собакоподібних мавп

Клітини щурів з базофілічним лейкозом (RBL-2H3), культивовані при 37 °C/5% CO<sub>2</sub> та рутинно субкультивовані у MEM-середовищі Ігла (Invitrogen), у яке були додані 1 x замінні амінокислоти, 0,15% бікарбонату натрію, 1 мМ пірувату натрію та 15% фетальної бичачої сироватки (Invitrogen), піддавали нуклеофекції шляхом електропорації (Амаха Biosystems) відповідно до інструкцій виробників. Трансфіковані клітини інкубували при 37 °C/5% CO<sub>2</sub>, та через 24 години після трансфекції проводили відбір на антибіотики шляхом додавання генетицину до кінцевої концентрації 1 мг/мл. Трансфіковані клітини культивували та субкультивували протягом 3-5 днів у середовищі для відбору, а потім піддавали моноклітинному сортиру шляхом серійного розведення у 96-лункових планшетах. Приблизно через два тижні, колонії, що виявляють активний ріст, розмножували, а потім аналізували на експресію транскрипту CXCR2 собакоподібних мавп. Позитивні клони також додатково розмножували для проведення аналізу.

## Гібрид CHO-Trex (HA)3-huCXCR2 та (HA)3huCCR9-CXCR2

Клітини яєчника китайського хом'ячку T-Rex (T-rex™-CHO, Invitrogen, #R718-07) витримували при 37 °C у вигляді моношарових культур у середовищі Хемса F12, що містить 2 мМ L-глутаміну, у яку було додано 10% фетальної бичачої сироватки, що не містить тетрацикліну (FBS) (Biosera), 1% пеніциліну/стрептоміцину та 10 мкг/мг бластицидину. Клітинна лінія з регульованою тетрацикліном експресією (T-Rex™) стабільно експресувала тетрацикліновий репресор (TetR). Потім одержували стабільні клітинні лінії, що експресують CXCR2-конструкції, відповідно до процедури нуклеофекції (Набір для нуклеофекції клітинних ліній Т, Амаха Biosystem, програма U-23). Трансфіковані клітини інкубували при 37 °C/5% CO<sub>2</sub> та обробляли 300 мкг/мл зеоцину через 48 годин після трансфекції. Клітини культивували протягом двох тижнів у присутності зеоцину для відбору на позитивні трансформанти, а потім проводили моноклітинний сортир на FACS-сортері Мо-Фло. Через два тижні, колонії, що виявляють активний ріст, розмножували та витримували у стандартному середовищі для їхнього культивування при концентрації зеоцину 300 мкг/мл.

## 3. Gro-α людини, Gro-α собакоподібних мавп, IL-8 людини, ENA-78 людини

Таблиця 4

NVTS-IL-8, ENA-78, Gro- $\alpha$  собакоподібних мавп

Ліганд	Коментарі	Джерело
Gro- $\alpha$ людини	Рекомбінантний	Biosource (PHC1063)
IL-8 людини	Рекомбінантний	Novartis Vienna
ENA-78 людини	Рекомбінантний	Peprtech Ltd (300-22)
Gro- $\alpha$ собакоподібних мавп	Рекомбінантний	ALMAC Sciences

## 4. Пептиди

- Пептиди, що представляють собою різні N-кінцеві фрагменти та фрагменти позаклітинної петлі (EL) CXCR2 людини та собакоподібних мавп, були закуплені у Bachem (таблиця 5). У пептидах, що називаються "циклічними", перша та остання амінокислоти були замінені цистеїновим залишком, а природні внутрішні цистеїни у послідовності дикого типу були замінені лейциновим залишком. Ці пептиди були піддані реакції циклізації під дією фланкуючих цистеїнових залишків.

Таблиця 5

Назва	Послідовність	Модифікація
1-14 собакоподібних мавп	MQSFNFEDFWENED SEQ ID NO:4	C-кінець, кон'югований з біотином
Циклічний EL3 собакоподібних мавп	CTLMRTRLINETLQRRNC SEQ ID NO:5	N-кінець, кон'югований з біотином або з KLN
Циклічний EL2 собакоподібних мавп	CRRTVYLTYISPLYEDMGNNALWC SEQ ID NO:6	N-кінець, кон'югований з біотином або з KLN
1-19 людини	MEDFNMESDSFEDFWKGED SEQ ID NO:7	C-кінець, кон'югований з біотином
18-48 людини	EDLSNYSYSSTLPPFLDAPCEPESLEI SEQ ID NO:8	C-кінець, кон'югований з біотином
EL2 людини	FRRTVYSSNVSPACYEDMGNNANWR SEQ ID NO:9	N-кінець, кон'югований з біотином або з KLN
Циклічний EL2 людини	CRRTVYSSNVSPALYEDMGNNANWC SEQ ID NO:10	N-кінець, кон'югований з біотином або з KLN
EL3 людини	DTLMRTQVIQETCERRNH SEQ ID NO:11	N-кінець, кон'югований з біотином або з KLN
Циклічний EL3 людини	CTLMRTQVIQETLERRNC SEQ ID NO:12	N-кінець, кон'югований з біотином або з KLN

## 5. Імунізація

- Три лами були імунізовані 7-9 разів клітинами ссавців, експресуючими CXCR2 людини, а одна лама була імунізована 6 разів клітинами ссавців, експресуючими CXCR2 собакоподібних мавп. Така схема імунізації включала чотири введення коктейлю з кон'югату "пептид-гемоціанін лімфи равлика (KLH)", змішаного з (не)повним ад'ювантом Фрейнда; пептидів, що представляють собою позаклітинні петлі CXCR2 людини та собакоподібних мавп №№ 2 і 3 (див. таблицю 5). Вісім інших лам були імунізовані 4-5 разів ДНК, що кодує людський повнорозмірний CXCR2 або  $\Delta$ 1-17 CXCR2, експресований з pVAX1 з наступним одним введенням клітин ссавців, експресуючих людський повнорозмірний CXCR2. Три інших лами були імунізовані 4 рази ДНК, що кодує CXCR2 собакоподібних мавп, експресований з pVAX1, з наступним одним введенням клітин ссавців, експресуючих CXCR2 собакоподібних мавп. Через чотири та вісім днів після введення кожного антигену брали проби імунної крові та зразки лімфовузлів.

## 6. Конструювання бібліотеки

- Зразки кДНК одержували із усіх РНК-препаратів імунної крові та зразків лімфовузлів. Нуклеотидні послідовності, що кодують нанотіла, були ампліфіковані зі зразків кДНК, взятих у всіх лам, імунізованих CXCR2 людини або собакоподібних мавп, шляхом проведення одностадійної ОТ-ПЛР-реакції з використанням праймерів ABL051, ABL052 і ABL003. Послідовності праймерів представлено у таблиці 6. 700 п.н.-амплікони, ампліфіковані із кДНК IgG2 і IgG3 у зразку, виділяли з гелю, а потім використовували як матрицю в "гніздовій" ПЛР-



реакції, проведений з використанням праймера ABL050, що містить сайт рестрикуючого ферменту SfiI, та праймера ABL003. Потім ПЛР-продукти гідролізували ферментами SfiI та BstEII (звичайно присутніми у FR4 генів  $V_{HH}$ ) та лігували у відповідні рестрикційні сайти фагмідного вектору рAX50 з одержанням бібліотеки після електропорації у TG-1 *Escherichia coli*. рAX50 являє собою вектор експресії, отриманий з рUC119, що містить промотор LacZ, послідовність, що кодує білок фагових ворсинок *E. coli*, ген резистентності до ампіциліну або карбеніциліну, сайт множинного клонування та лідерну послідовність *gen3*. Послідовність, що кодує нанотіло®, та вектор, що кодує С-кінцеву с-тус-мітку та (His)6-мітку, знаходяться у одній рамці зчитування. Фагмідний вектор дозволяє продукувати фагові частки, що експресують окремі нанотіла у вигляді злитого білка із продуктом *genIII*.

Таблиця 6

## Послідовності праймерів

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	TGTAACGACGGCCAGT	SEQ ID NO. 17
M13Rev	CAGGAAACAGCTATGACC	SEQ ID NO. 18
Rev_30GlySer	TCAGTAACCTGGATCCCCGCCACCGCTGCCTCCACCGCCGCTACCCCGCCACCG 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. Відбір

Вищезгадані рAX50-бібліотеки нанотіл, експресовані на поверхні бактеріофагів, відбирали з використанням пептидів, мембранних екстрактів та цілих клітин, презентуючих епітопи CXCR2.

Відбір з використанням пептидів полягав у інкубуванні фагових бібліотек на 0-1000 нМ біотинільованих пептидів (див. таблицю 5), іммобілізованих на покритих нейтравідином (Pierce, 31000) мікротитраційних планшетах Maxisorp (Nunc, 430341). Альтернативно, фагові бібліотеки інкубували у розчині з 10 нМ біотинільованого пептиду, а потім іммобілізували на комплексах "пептид-фаг" на сферах Dynabeads, покритих стрептавідином (Invitrogen, 112-06D). Блокування здійснювали з використанням PBS, у який був доданий 1% казеїн. Потім додавали фаги, отримані з бібліотек, та інкубували протягом 1 години (у PBS, у який були додані 0,1% казеїн та 0,1% твін-20). Незв'язані фаги відмивали (PBS, у який був доданий 0,05% твін-20), а зв'язаний фаг елюювали додаванням трипсину (1 мг/мл у PBS) протягом 15 хвилин. Наступні раунди відбору проводили, в основному, як описано вище.

Відбір з використанням мембранних екстрактів здійснювали шляхом покриття пробірок для імуноаналізу (Nunc, 444474) 50 мкг/мл мембранних екстрактів (загального білку), отриманих із клітин, експресуючих CXCR2 людини (Perkin Elmer, ES-145-M400UA і 6110524400UA). Покриття мембранними екстрактами, отриманими із клітин CHO, експресуючих FPR1 людини (Perkin Elmer, 6110527400UA), і використовували як негативний контроль, проводили одночасно. Блокування здійснювали з використанням PBS, у який було додано 4% сухе сепароване молоко Marvel. Фаги інкубували протягом 2 годин (у PBS, у який було додано 1% сепароване сухе молоко Marvel). Незв'язані фаги відмивали PBS, а зв'язані фаги елюювали додаванням трипсину (1 мг/мл у PBS) протягом 15 хвилин. Наступні раунди відбору здійснювали, в

основному, як описано вище. У деяких випадках, фаги, що зв'язуються з нерелевантними епітопами "клітинного фону", піддавали специфічному виснаженню шляхом попередньої абсорбції фагу у додаткових пробірках або лунках, покритих контрольними мембранними екстрактами. Потім проводили інкубування у лунках, що містять CXCR2 людини та які

мембранними екстрактами, у присутності контрольного мембранного екстракту у розчині. У інших експериментах, після проведення одного або двох раундів відбору на пептидах здійснювали ще один раунд відбору на мембранних екстрактах, або навпаки.

У іншій серії експериментів, 1-5 мільйонів клітин ссавців, експресуючих CXCR2 людини або собакоподібних мавп, інкубували з фаговими бібліотеками у PBS, у який були додано 10% FBS та 1% сухе сепароване молоко Marvel. Нетрансформовані клітинні лінії використовували як негативний контроль. Незв'язані фаги відмивали PBS, а зв'язаний фаг елюювали додаванням трипсину (1 мг/мл у PBS) протягом 15 хвилин. Наступні раунди проводили, в основному, як описано вище, за винятком того, що на відміну від першого раунду, у цих раундах використовували іншу "фонову" клітинну лінію.

У інших експериментах, фаги інкубували з мембранними екстрактами або із клітинами ссавців, експресуючих CXCR2, у присутності 1 мкМ пептидів (див. таблицю 5) у розчині, для зменшення числа фагів, експресуючих нанотіла, що зв'язуються з областями, представленими цими пептидами.

#### 8. Одержання періплазматичних екстрактів

Клітини TG-1, що знаходяться на стадії експонентного росту, інфікували елюйованими фагами, а потім ці клітини висівали на планшети з агаром LB, що містять карбеніцилін. Клоні, резистентні до карбеніциліну, аналізували на присутність вставки, і підтверджували послідовності позитивних клонів. Клоні, що представляють інтерес, культивували у середовищі TB, у яку був доданий карбеніцилін, та індукували шляхом додавання IPTG для ініціації експресії. Таку експресію підтримували протягом 4 годин при 37 °C, а потім клітини центрифугували. Осад нічних заморожених клітин, отриманий з експресійних культур E. coli, розчиняли у PBS (1/10 об'єму вихідної культури) та інкубували при 4 °C протягом 1 години при обережному струшуванні. Потім клітини центрифугували ще один раз, та супернатант, що містить білки, секретовані у періплазматичний простір, залишали на зберігання.

#### 9. Скринінг

Періплазматичні екстракти (описані вище) піддавали FACS-аналізу на конкурування з Gro-α за зв'язування з CXCR2 людини.  $2 \times 10^5$  клітин інкубували з 1/2 розведенням періплазматичних екстрактів у FACS-буфері (PBS+10% фетальна бичача сироватка (Sigma, F7524)) протягом 30 хвилин при 4 °C. Потім додавали рівний об'єм 6 нМ FMAT Blue-міченого Gro-α людини у FACS-буфері, та інкубування продовжували ще 30 хвилин при 4 °C у темряві. Потім клітини три рази промивали у FACS-буфері, і нарешті, ресуспендували у FACS-буфері. Загиблі клітини забарвлювали йодидом пропідію (Sigma, P4170). Потім зразки аналізували на обладнанні FACSarray (BD Biosciences). У таблиці 7 представлений список нанотіл, періплазматичні екстракти яких конкурують із Gro-α за зв'язування з CXCR2 людини.

Таблиця 7

Конкурування з Gro-α за зв'язування з CXCR2 людини (періплазматичні екстракти)

Назва	Фас-Аналіз на конкурування з Gro-α (% інгібування)
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

Таблиця 7

Конкурування з Gro-α за зв'язування з CXCR2 людини (періплазматичні екстракти)

Назва	Фасc-Аналіз на конкурування з Gro-α (% інгібування)
145C9	53,5
163D2	86,8
163E3	80,1
2B2	38,1
Сліпий контроль	0,4

- У іншій серії експериментів, періплазматичні екстракти аналізували на зв'язування з пептидом людини з 1-19 амінокислотних залишків за допомогою ELISA. Планшети Maxisorb (Nunc, 430341) покривали протягом двох годин нейтравідином, а потім блокували протягом однієї години (PBS, 1% казеїном). Потім, у ці планшети протягом однієї години додавали 100 нМ біотинільованого пептиду 1-19 людини (PBS, 0,1% казеїн, 0,05% твін-20), після чого проводили інкубування протягом однієї години з 10-кратними розведеннями періплазматичних екстрактів. Незв'язані періплазматичні екстракти відмивали (PBS, у який був додано 0,05% твін-20), а зв'язані нанотіла детектували з використанням мишачого анти-мус антитіла (Roche, 11667149001), а потім ПХ-кон'югованого кролячого антимишачого антитіла (Dakocytomation, P0260). У таблиці 8 систематизовані відносини сигналу зв'язування анти-CXCR2 нанотіл до сигналу нерелевантного контрольного нанотіла.

Таблиця 8

Зв'язування періплазматичних екстрактів з пептидом 1-19 CXCR2 людини

Назва	ELISA-аналіз на зв'язування з N-кінцевими амінокислотами 1-19 пептиду (відношення сигналу зв'язування до сигналу сліпого контролю)
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

- 15 10. Послідовності

## Послідовності одновалентних анти-CXCR2 нанотіл

<b>143B03</b>	SEQ ID NO. 25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYWMYWRQAPGKGLDWVSAIN AGGDSTYYADPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCATVRGTAR DLDYWGQGTQVTVSS
<b>139D05</b>	SEQ ID NO. 26	EVKLVESGGGLVQAGGSLRLSCALSGRIGSINAMGWYRQVSGQQR ELVAVSRSGGSTDIADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMDSLKPEDTAV YYCYAHTSSYSNWRVYNNDYWGQGTQVTVSS
<b>146A06</b>	SEQ ID NO. 27	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLTCAASGRIGTINAMGWYRQAPGKQR ELVAVITSGGRIDYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVY YYNVETVVGAVYWGQGTQVTVSS
<b>147A01</b>	SEQ ID NO. 28	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRMGNNINAMGWYRQAPGKER ELVAKITRGGAITYADSVKGRFTIARDNINLNTAYLQMNLDLKPEDTAVYY YNVDGGPSQNYWGQGTQVTVSS
<b>145C09</b>	SEQ ID NO. 29	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQAPGKERE RVSCISGSDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAV YYCAAYWGLTLRLWMPPHRYDYWGQGTQVTVSS
<b>145D03</b>	SEQ ID NO. 30	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLIFRLSGMAWYRQAPGRQR EWWAVLTKDGLHYADPVKGRFTISRNNNAENTWYLQMNLSLKPEDTAI YYCNTGRYWGQGTQVTVSS
<b>144D01</b>	SEQ ID NO. 31	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGTIGTIRAMGWYRQAPGKQRE LVALITSTGRINYADSVKGRFTIGRDNKNTAYLQMNLSLKPEDTAVYY YNIETLRRNYWGQGTQVTVSS
<b>139H02</b>	SEQ ID NO. 32	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYAMGWFRQATGKEREFVAAI NKSGGNTHYAGSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAASRTN PKPDYWGQGTQVTVSS
<b>139A08</b>	SEQ ID NO. 33	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFSRSAMGWLRQAPGKEREFVAG ISWGGDNSSYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMNLSLKPQDTAVYYCAARYR GGAAGVAGWEYWGQGTQVTVSS
<b>137A08</b>	SEQ ID NO. 34	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTLAYTVGWFRAPGKEREGISCIS SSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADRRTD CKKGRVSGSGWGQGTQVTVSS
<b>143A05</b>	SEQ ID NO. 35	KVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFNYYVMAWFRQAQGKEREFVAAI STRGSMTKYSDSVQGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKPEDTAVYYCAADPRG SSWSFSSGGYDYWGQGTQVTVSS
<b>137B07</b>	SEQ ID NO. 36	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGPQKAREWVAGI NSDGTNTYADPVKGRFTISRDNKNTIYLMHMDMLKPEDTAVYYCASGKYRGQ GTQVTVSS
<b>127D01</b>	SEQ ID NO. 37	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFDFKVMGWYRQPPGKQREGVAA IRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCKVNIRGQ DYWGQGTQVTVSS
<b>126B11</b>	SEQ ID NO. 38	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGSSFRINTMGWYRRAPGKQRELVAAR DRGGYINYVDSVKGRFTVSRDNKPTMYLQMNLSLKPEDTAVYYCHAGTQDR TGRNFDHWGQGTQVTVSS
<b>097A09</b>	SEQ ID NO. 39	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQRELVAIT SGGNINYIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAEIVLVGV WTQRARTGNVWGQGTQVTVSS
<b>159B10</b>	SEQ ID NO. 40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSLSMGWFRQAPGKERAFVAA LTRNGGYRYADSVKGRFTISRDAKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADSLS GSDYLGNTLDYWGQGTQVTVSS
<b>163D02</b>	SEQ ID NO.	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAI

Таблиця 9

	41	TWNGGRVFTASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDR RTDYLGHVPAYWGQGTQVTVSS
163E03	SEQ ID NO. 42	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAI TWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGS SWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
2B2	SEQ ID NO. 43	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQRELVRR TRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCMLDDRGGV YWGQGTQVTVSS
54B12	SEQ ID NO. 90	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQRELVAAR DRGGYINYVDSVKGRFTVSRDNKPTMYLQMNSLKPEDTAVYYCHAGTQDR TGRNFDWRWGQGTQVTVSS

Приклади характеристики одновалентних нанотіл

11. Конструювання одновалентних нанотіл

- 5 Нанотіла ДНК-фрагменти, що містять, отримані за допомогою ПЛР на функціональних фагмідних клонах з використанням праймерів Fwd-EVQL-MfeI та Rev-TVSS-BstEII (таблиця 1), гідролізували ферментами MfeI та BstEII, лігували у вектор pAX100 та трансформували у компетентні клітини TG-1 E. coli. pAX100 являє собою вектор експресії, що походить від плазмиди pUC119, що містить промотор LacZ, ген резистентності до канаміцину, сайт
- 10 множинного клонування та лідерну послідовність OmpA. Кодуюча послідовність нанотіла та вектор, що кодує С-Кінцеву с-тис-мітку та His6-мітку, знаходяться у одній рамці зчитування. Клоні, резистентні до канаміцину, аналізували на присутність вставки, а потім підтверджували послідовності позитивних клонів.

12. Експресія у лабораторному масштабі

- 15 Клітини TG-1, що містять вектори експресії, що кодують нанотіла, що представляють інтерес, культивували у шейкерних колбах з перегородкою, що містять середовище TB плюс 100 мкг/мл канаміцину, та індукували додаванням 1 мМ IPTG для експресії. Експресію здійснювали протягом 4 годин при 37 °C. Після збору клітин одержували періплазматичні екстракти, та His6-мічені нанотіла очищали за допомогою афінної хроматографії на колонці з
- 20 іммобілізованим металом (HisTrap FF Crude, GE Healthcare), а потім знесолювали (HiPrep 26/10, GE Healthcare) або піддавали гель-фільтрації (Superdex 75 HR16/10, GE Healthcare) у PBS.

13. Аналіз на лігандне конкурування

- Очищені одновалентні анти-CXCR2 нанотіла титрували проти 3 нМ FMAT-Blue-міченого G $\alpha$  у FACS-аналізі на лігандне конкурування CXCR2 людини та CXCR2 собакоподібних мавп (таблиця 10). Для CXCR2 людини, блокуюча активність становить в інтервалах між подвоєними
- 25 нМ-величинами та суб-нМ-величинами, а для CXCR2 собакоподібних мавп, ця активність становить в інтервалах між величиною нМ і подвоєною величиною нМ.

Таблиця 10

Активність у конкуруванні одновалентних анти-CXCR2 нанотіл з лігандами

	CXCR2 людини		CXCR2 собакоподібних мавп	
	IC50 (M)	% інгібування (макс.)	IC50 (M)	% інгібування (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: активність не могла бути виміряна

## 14. Функціональні аналізи з використанням рекомбінантних клітинних ліній

(1) Оцінка індукованого агоністом вивільнення внутрішньоклітинного кальцію (FLIPR). Еритроцити (RBL), експресуючі рецептор CXCR2 людини або рецептор CXCR2 собакоподібних мавп, висівали у 96-лункові планшети та інкубували протягом ночі при 37 °C. У день проведення експерименту, у клітини вводили барвник Fluo-4 та залишали на 30 хвилин при 37 °C, а потім піддавали 30-хвилинному інкубуванню з очищеними одновалентними анти-CXCR2 нанотілами. І нарешті додавали Gro-α на планшет-рідері для флуориметричної візуалізації (FLIPR), а потім детектували флуоресцентний сигнал, що відповідає вивільненню внутрішньоклітинного кальцію. Аналіз на селективність здійснювали з використанням клітин L2071, експресуючих CXCR1 людини. Протокол аналізу для CXCR1 був аналогічний протоколу аналізу для CXCR2, за винятком того, що в аналізі CXCR1, як агоніст використовували IL-8. Сума середніх значень IC<sub>50</sub> представлена у таблиці 11, при цьому, слід зазначити, що жодне з тестованих нанотіл не виявляло якого-небудь інгібування індукованого агоністом вивільнення внутрішньоклітинного кальцію при тестуємих концентраціях рецептору CXCR1 (максимальна концентрація 1 мкМ).

(2) Оцінка стимульованої агоністом акумуляції [<sup>35</sup>S]GTPγS

Очищені одновалентні анти-CXCR2 нанотіла інкубували протягом 60 хвилин з Gro-α, GDP, SPA-сферами та з CHO-CXC2-мембранами, виділеними із клітин CHO, експресуючих рецептор CXCR2 людини, у 96-лунковому планшеті. Потім додавали [<sup>35</sup>S]GTPγS та інкубували ще 60 хвилин. І нарешті, планшет центрифугували, а потім зчитували на Topcount. Сума середніх значень IC<sub>50</sub> зазначена у таблиці 11.

Таблиця 11

Величини IC<sub>50</sub> для очищених одновалентних анти-CXCR2 нанотіл ® у функціональних аналізах, які виконували з використанням рекомбінантних клітинних ліній

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

\*Криві були обмежено 100% інгібуванням, оскільки при тестованих концентраціях плато не спостерігалось. NA: активність не могла бути виміряна. ND – не вимірювали.

## 15. Функціональні аналізи з використанням первинних нейтрофілів

## (1) Аналіз на зміну форми нейтрофілів цільної крові людини (hWBSC)

Донорами були здорові добровольці, які не зазнали системної терапії (група донорів, Novartis Horsham). Цільну кров, яку обробляли антикоагулянтом, а саме, 52 мМ EDTA (стерильним), збирали у відношенні 1 мл EDTA:9 мл крові. Кров брали при кімнатній температурі, і перед використанням, попередньо нагрівали до 37 °C. 80 мкл цільної крові, перед стимуляцією хемокином, попередньо інкубували з анти-CXCR2 нанотілами протягом 10 хвилин при кімнатній температурі (10 точок на дозову відповідь (0,03-1,144 x 10<sup>-7</sup> мкМ); при цьому, в усі лунки додавали 10 мкл rhGROα (приблизна концентрація EC<sub>70</sub> становила 2 нМ), за винятком лунки із сполукою "нуль", у яку додавали 10 мкл буферу для аналізу на зміну форми клітин. Зразки обережно струшували та інкубували ще 5 хвилин при 37 °C. Потім пробірки поміщали на лід та додавали 250 мкл охолодженого льодом та оптимізованого розчину CellFix™, після чого пробірки обережно струшували та інкубували ще 5 хвилин, а потім в усі пробірки додавали 1,4

мл 1X розчину хлориду амонію для лізису та ці пробірки залишали на льоді ще на 20 хвилин. Після лізису еритроцитів, зразки аналізували на проточному цитометрі FACSCalibur (Becton Dickinson). Популяції клітин були ідентифіковані за дискримінаційним вікном прямого розсіювання/бічного розсіювання (FSC/SSC), а потім будували графіки для FSC/FL-2 за даними флуоресцентного збудження для гранулоцитів, представленими на першому графіку. На графіку FL-2, нейтрофіли були диференційовані від еозинофілів, оскільки еозинофіли мають більш високий рівень аутофлуоресценції. Було підраховано 5000 сигналів на зразок.

#### (2) Аналіз на хемотаксис нейтрофілів людини

Донорами були здорові добровольці, які не зазнали системної терапії (група донорів, Novartis Horsham). Цільну кров, яку обробляли антикоагулянтом, а саме, 52 mM EDTA (стерильним), збирали у відношенні 1 мл EDTA:9 мл крові. Лейкоцити виділяли у відповідності зі стандартними протоколами: до 20 мл крові, обробленої антикоагулянтами, додавали 4% декстран, обережно змішували, а потім інкубували на льоді протягом 30 хвилин для осадження еритроцитів. Потім супернатант-утримуючі мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК) наносили шаром на Фіколл-Пак® у градієнті щільності та центрифугували при 300 x g протягом 25 хвилин при 18 °C. МКПК-багату фракцію ресуспендували у 500 мкл 1 x PBS, та здійснювали лізис еритроцитів з використанням білків гіпотонічного шоку. До осаду додавали 20 мл охолодженої льодом стерильної дистильованої води, що не містить ендотоксинів, і суміш залишали для лізису на 30-40 секунд, після чого додавали 20 мл 2 x PBS. Зразок обережно змішували та центрифугували при 300 x g протягом 10 хвилин при 18 °C з одержанням гранулоцитів. Гранулоцитарний осад ресуспендували у 500 мкл 1 x PBS та два рази промивали 50 мл 1 x PBS. Потім гранулоцитарний осад ресуспендували у середовищі RPMI 1640, pH 7,4, плюс 2,5% FBS, підраховували та розводили до кінцевої концентрації  $2 \times 10^6$ /мл. Міграцію оцінювали на планшетах Transwell, що містять 3 мкм PET-мембран від Becton Dickinson. Коротко, перед поміщенням мембрани для багатолучкового планшета у нижнє положення, на дно лунок планшета (1000 мкл/лунку) додавали 6 нМ Gro- $\alpha$  (EC<sub>80</sub>-EC<sub>100</sub>), а потім на цю мембрану додавали МКПК (500 мкл/лунку), які були попередньо інкубовані з різними концентраціями нанотіла (0,13-1000 нМ для одновалентних нанотіл або 0,6 нМ - 30 нМ для біпаратопних нанотіл) протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Потім планшети інкубували при 37 °C протягом 90 хвилин, та клітини, які мігрували на дно камери для хемотаксису, підраховували на проточному цитометрі FACSCalibur. Проточний цитометр був встановлений на число сигналів у дискримінаційному вікні R2, виходячи із графіка FSC/FL-2, за встановлений час 20 секунд на зразок.

#### (3) Аналіз на зміну форми нейтрофілів цільної крові собакоподібних мавп (CynoWBSC)

Венозну кров, взятую або з передпліччя, або з нижньої кінцівки, обробляли антикоагулянтом 3,8% цитрату натрію (стерильного) у відношенні 1 мл цитрату натрію : 9 мл крові. Кров брали при кімнатній температурі та, перед використанням, попередньо нагрівали до 37 °C. 80 мкл цільної крові, перед стимуляцією хемокіном, попередньо інкубували з анти-CXCR2 нанотілами протягом 10 хвилин при кімнатній температурі (10 точок на дозову відповідь ( $0,03$ - $1,144 \times 10^{-7}$  мкМ); при цьому, в усі лунки додавали 10 мкл rhGRO $\alpha$  (приблизна концентрація EC<sub>70-90</sub> становила 30 нМ), за винятком лунок із сполукою "нуль", у які додавали 10 мкл буфера для аналізу на зміну форми клітин. Зразки обережно струшували та інкубували ще 5 хвилин при 37 °C. Потім пробірки поміщали на лід та додавали 250 мкл охолодженого льодом і оптимізованого розчину CellFix™, після чого пробірки обережно струшували та інкубували ще 5 хвилин, а потім в усі пробірки додавали 2 мл буфера для лізису (Sigma Aldrich #R7757), та ці пробірки залишали на льоді ще на 40-60 хвилин. Після лізису еритроцитів, зразки аналізували на проточному цитометрі FACSCalibur (Becton Dickinson). Популяції клітин були ідентифіковані за дискримінаційним вікном прямого розсіювання/бічного розсіювання (FSC/SSC), а потім будували графіки для FSC/FL-2 за даними флуоресцентного збудження для гранулоцитів, представленими на першому графіку. На графіку FL-2, нейтрофіли були диференційовані від еозинофілів, оскільки еозинофіли мають більш високий рівень аутофлуоресценції. Було підраховано 5000 сигналів на зразок.

Таблиця 12

Величини IC<sub>50</sub> для очищених одновалентних анти-CXCR2 нанотіл у функціональних аналізах, проведених з використанням первинних нейтрофілів та rhGROα

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

Мультивалентні нанотіла

16. Конструювання двовалентних нанотіл

5 Для конструювання двовалентних нанотіл були застосовані два підходи.

ПЛР-ампліфікацію проводили на плазмідній ДНК, що кодує одновалентні структурні блоки. N-кінцевий структурний блок ампліфікували з використанням Fwd-EVQL-MfeI та зворотного праймера, що кодує частину лінкеру GlySer, а C-кінцевий структурний блок ампліфікували з використанням прямого праймера, що кодує іншу частину лінкеру GlySer та Rev-TVSS-BstEII (таблиця 6). N-кінцевий фрагмент гідролізували ферментами MfeI та BamHI, а C-кінцевий фрагмент гідролізували ферментами BamHI та BstII, після чого, ці фрагменти одночасно лігували у вектор pAX100 та вводили у компетентні клітини TG-1 E. coli.

Альтернативно, різні ПЛР-ампліфікації проводили на плазмідній ДНК, що кодує одновалентні структурні блоки. N-кінцевий структурний блок ампліфікували з використанням Fwd-EVQL-MfeI та Rev-TVSS-BspEI, а C-кінцевий структурний блок ампліфікували з використанням Fwd-EVQL-BamHI та Rev-TVSS-BstEII (таблиця 6). N-кінцевий фрагмент гідролізували ферментами MfeI та BamHI, а C-кінцевий фрагмент гідролізували ферментами BspEI та BstII. N-кінцевий фрагмент лігували (MfeI -BspEI) у pAX100-похідну, що містить послідовність, що кодує лінкер GlySer, та вводили в компетентні клітини TG-1 E. coli. Потім із суміші для трансформації одержували плазмідну ДНК, та отриману ДНК гідролізували ферментами BspEI і BstEII, після чого, C-кінцевий фрагмент лігували у вектор pAX100 та вводили в компетентні клітини TG-1 E. coli.

Резистентні до канаміцину клони аналізували на присутність вставки та підтверджували послідовності позитивних клонів.

17. Послідовності мультивалентних анти-CXCR2 нанотіл

Таблиця 13

<b>CXCR2001</b> <b>1</b>	<b>97A9-35GS-</b> <b>97A9</b>  <b>SEQ ID NO. 44</b>	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDN TKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNA EIVVLVGWWTQRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGG GGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASG SIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDN TKN TVYLQMNSLKPEDTAVYYCNAEIVVLVGWWTQRARTGNYWGQGTQVT VSS
-----------------------------	--	---



<b>CXCR2001 2</b>	<b>137B7-35GS- 137B7</b>  SEQ ID NO. 45	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGP GKAREW VAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDN AKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYCA SGKYRGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGP GKAREWVAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDN AKNTIYLHMDMLKPED TAVYYCASGKYRGQGTQVTVSS
<b>CXCR2001 3</b>	<b>2B2-35GS- 97A9</b>  SEQ ID NO. 46	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWY RQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDN TKNTVY LQMNSLK PEDTAVYYCNAEIVLVGWWTQRARTGNYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2001 4</b>	<b>97A9-35GS- 2B2</b>  SEQ ID NO. 47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDN TKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCNA EIVLVGWWTQRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSG GGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASG SILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAK KTMYLQMNSLKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2001 5</b>	<b>2B2-35GS- 137B7</b>  SEQ ID NO. 48	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGW TRQGP GKAREWVAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDN AKNTIYLHMDML KPEDTAVYYCASGKYRGQGTQVTVSS
<b>CXCR2001 6</b>	<b>137B7-35GS- 2B2</b>  SEQ ID NO. 49	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGP GKAREW VAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDN AKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYCA SGKYRGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGGSEVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAP GKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPED TAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2001 7</b>	<b>97A9-35GS- 137B7</b>  SEQ ID NO. 50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDN TKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCNA EIVLVGWWTQRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSG GGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGI IFRLSALGWTRQGP GKAREWVAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDN AK NTIYLHMDMLKPEDTAVYYCASGKYRGQGTQVTVSS
<b>CXCR2001 8</b>	<b>137B7-35GS- 97A9</b>  SEQ ID NO. 51	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGP GKAREW VAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDN AKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYCA SGKYRGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTP GKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDN TKNTVY LQMNSLKPEDTA VYYCNAEIVLVGWWTQRARTGNYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2001 9</b>	<b>2B2-9GS-2B2</b>  SEQ ID NO. 52	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGELVQPGGG

		LRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQRELVVRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2002 0</b>	<b>127D1-35GS- 163D2</b>  SEQ ID NO. 53	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFDKVMGWYRQPPGKQREGVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREVFAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2002 1</b>	<b>127D1-35GS- 163E3</b>  SEQ ID NO. 54	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFDKVMGWYRQPPGKQREGVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREVFAAITWRSNGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2002 2</b>	<b>163D2-35GS- 163D2</b>  SEQ ID NO. 55	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREVFAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREVFAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2002 3</b>	<b>163D2-35GS- 163E3</b>  SEQ ID NO. 56	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREVFAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREVFAAITWRSNGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2002 4</b>	<b>163E3-35GS- 163E3</b>  SEQ ID NO. 57	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREVFAAITWRSNGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREVFAAITWRSNGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2002 5</b>	<b>163D2-35GS- 127D1</b>  SEQ ID NO. 58	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREVFAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFDKVMGWYRQPPGKQREGVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2002 6</b>	<b>163E3-35GS- 127D1</b>  SEQ ID NO. 59	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREVFAAITWRSNGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFDKVMGWYRQPPGKQREGVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2002 7</b>	<b>163E3-35GS- 163D2</b>  SEQ ID NO. 60	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREVFAAITWRSNGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREVFAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2002 8</b>	<b>97A9-35GS- 54B12</b>	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQRELVADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNA

	SEQ ID NO. 61	EIVVLGVWVTQRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDN AKPTMYLQMNLSKPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFDRWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2002 9</b>	<b>163E3-35GS- 54B12</b>  SEQ ID NO. 62	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDN AKNTVYLQMNLSKPEDTAVY YCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDN AKPTMYLQMNLSKPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFDRWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2003 0</b>	<b>163D2-35GS- 54B12</b>  SEQ ID NO. 63	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDN AKNTMYLQMNLSKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDN AKPTMYLQMNLSKPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFDRWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2003 1</b>	<b>2B2-35GS- 163E3</b>  SEQ ID NO. 64	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADI AKTMYLQMNLSKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDN AKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2003 2</b>	<b>2B2-35GS- 163D2</b>  SEQ ID NO. 65	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADI AKTMYLQMNLSKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDN AKNTMYLQMNLSKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2003 3</b>	<b>163E3-35GS- 2B2</b>  SEQ ID NO. 66	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDN AKNTVYLQMNLSKPEDTAVY YCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADI AKTMYLQMNLSKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2003 4</b>	<b>163D2-35GS- 2B2</b>  SEQ ID NO. 67	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDN AKNTMYLQMNLSKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADI AKTMYLQMNLSKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2003 5</b>	<b>54B12-35GS- 163E3</b>  SEQ ID NO. 68	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDN AKPTMYLQMNLSKPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFDRWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDN AKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2003 6</b>	<b>54B12-35GS- 163D2</b>  SEQ ID NO. 69	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDN AKPTMYLQMNLSKPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFDRWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDN AKNTMYLQMNLSKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSS

## 18. Аналіз на лігандне конкурування

Мультивалентні анти-CXCR2 нанотіла титрували проти 3 нМ Fmat-Blue-Міченого Gro- $\alpha$  в FACS-аналізі на лігандне конкурування CXCR2 людини та CXCR2 собакоподібних мавп (таблиця 14). Для CXCR2 людини блокуюча активність становила в інтервалах між подвоєними нМ-величинами та суб-нМ-величинами, а для CXCR2 собакоподібних мавп, ця активність становила в інтервалах між величиною нМ та подвоєною величиною нМ.

Таблиця 14

## Аналіз на лігандне конкурування мультивалентних анти-CXCR2 нанотіл

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

ND - не визначали

## 19. Функціональні аналізи з використанням рекомбінантних клітинних ліній

(1) Оцінка індукованого агоністом вивільнення внутрішньоклітинного кальцію (FLIPR). Еритроцити (RBL), що експресують рецептор CXCR2 людини або рецептор CXCR2 собакоподібних мавп, висівали у 96-лункові планшети та інкубували протягом ночі при 37 °C. У день проведення експерименту, у клітини вводили барвник Fluo-4 та залишали на 30 хвилин при 37 °C, а потім піддавали 30-хвилинному інкубуванню з очищеними мультивалентними анти-CXCR2 нанотілами. І нарешті, здійснювали додавання Gro- $\alpha$  з використанням планшет-рідера для флуориметричної візуалізації (FLIPR), а потім детектували флуоресцентний сигнал, що відповідає вивільненню внутрішньоклітинного кальцію. Аналізи на селективність здійснювали з використанням клітин L2071, експресуючих CXCR1 людини, та IL-8 як агоніст, а також клітин SEM, ендогенно експресуючих CXCR4 людини, та SDF-1 як агоніст, при цьому, протокол аналізу був аналогічний протоколу аналізу, описаного для CXCR2. Сума середніх величин IC<sub>50</sub>

представлена у таблиці 15. При цьому, слід зазначити, що жодне з тестуємих нанотіл не виявляло якого-небудь інгібування індукованого агоністом вивільнення внутрішньоклітинного кальцію при тестуємих концентраціях CXCR1 або CXCR4 (максимальна концентрація 1 мкМ).

(2) Оцінка стимульованої агоністом акумуляції [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S

Очищені мультивалентні анти-CXCR2 нанотіла інкубували протягом 60 хвилин з агоністом (GRO- $\alpha$ , IL-8 або ENA-78) GDP, SPA-сферами та з CHO-CXC2-мембранами, виділеними із клітин CHO, експресуючих рецептор CXCR2 людини, у 96-лунковому планшеті. Потім додавали [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S та інкубували ще 60 хвилин. І нарешті, планшет центрифугували, а потім зчитували на Topcount. Сума середніх значень IC<sub>50</sub> зазначена у таблиці 15.

Таблиця 15

Величини IC<sub>50</sub> для очищених мультивалентних анти-CXCR2 нанотіл у функціональному аналізі, який виконували для оцінки вивільнення внутрішньоклітинного кальцію з використанням рекомбінантних клітинних ліній

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

\*Криві були обмежені 100% інгібуванням, оскільки при тестуємих концентраціях плато не спостерігалось. ND – не визначали.



Таблиця 16

Величини IC<sub>50</sub> для очищених мультивалентних анти-CXCR2 нанотіл у функціональному аналізі, який виконували для оцінки акумуляції [<sup>35</sup>S]GTPγS в мембранах клітин CHO, що містили CXCR2 людини

		CXCR2 Людини (використовуючи різні агоністи)					
		GRO-α		IL-8		ENA-78	
		IC <sub>50</sub> (M)	% інгібування від макс.	IC <sub>50</sub> (M)	% інгібування від макс.	IC <sub>50</sub> (M)	% інгібування від 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 визначали

(3) Аналіз Шильда для визначення механізму дії анти-CXCR2 нанотіл

Аналіз Шильда здійснювали шляхом проведення аналізів на IL-8- та Gro-α-стимульовану акумуляцію [<sup>35</sup>S]GTPγS. Формат цього аналізу дозволяє врівноважувати агоніст та нанотіло перед додаванням [<sup>35</sup>S]GTPγS, що дозволяє запобігти утворенню яких-небудь артефактів неповної рівноваги, які можуть давати помилкову інтерпретацію цього механізму. Для цього будували криві залежності "концентрація агоніста-відповідь" з використанням зростаючих концентрацій нанотіла. Дані для двох одновалентних нанотіл 54B12 та 163E3 та дані, отримані для мультивалентного нанотіла, приводяться як приклади. Ці дані являють собою криві "концентрація – відповідь" для Gro-α, та аналогічні дані були отримані з використанням IL-8.

Одновалентні нанотіла 54B12 та 163E3 виявляють однакові алостеричні механізми дії, але по-різному впливають на інгібування агоніста. Алостеричний механізм дії нанотіла 54B12 та інших зв'язуючих агентів 1-19 проілюстрований паралельними зсувами вправо на кривій залежності "концентрація агоніста – відповідь" при низьких концентраціях нанотіла, але в присутності зростаючих концентрацій нанотіла, зсувів вправо більше не спостерігалось. Ефект насичення такого механізму, без зниження максимальної відповіді агоніста, є показником алостеричної дії на афінність агоніста. На противагу цьому, алостеричні механізми дії 163E3 та інших зв'язуючих агентів 1-19 проілюстрований паралельними зсувами вправо на кривій

залежності "концентрація агоніста – відповідь" у комбінації зі зниженням максимальної відповіді агоніста при більш високих концентраціях нанотіла. Такий ефект може бути насичуваним, але він не спостерігався при використовуваних концентраціях, однак, важливим спостереженням є зниження максимальної відповіді агоніста, яке вказує на алостеричний механізм дії відносно ефективності агоніста. І нарешті, мультивалентне нанотіло 54B12-163E3 діє за обома алостеричними механізмами та впливає на криву "концентрація агоніста – відповідь", яка представлена паралельними зсувами вправо при набагато менших концентраціях нанотіла та значним зниженням максимальної відповіді агоніста.

У цей час алостеричний модулятор визначають як модулятор, який зв'язується у сайті, що відрізняється від сайту зв'язування агоніста (ортостеричного ліганду), а це означає, що ортостеричний ліганд та алостеричний модулятор зв'язуються з рецептором одночасно. У цей час, автори даного винаходу не мають у своєму розпорядженні даних, що підтверджують цей факт, а тому, не претендуючи на яку-небудь конкретну теорію, автори відзначають, що сайт зв'язування нанотіла необов'язково відрізняється від сайту зв'язування агоніста, а, цілком ймовірно, ці сайти зв'язування перекриваються. Також не існує даних, що вказують на те, що агоніст та нанотіло зв'язуються з рецептором одночасно, хоча дані аналізу Шильда дозволяють припустити, що ці нанотіла є алостеричними модуляторами CXCR2.

#### 20. Функціональні аналізи – NSC

Ці аналізи проводилися за методами, описаними в розділі 15.

Таблиця 17

Величини  $IC_{50}$  для очищених біпаратопних анти-CXCR2 нанотіла у функціональних аналізах, проведених з використанням первинних нейтрофілів людини або собакоподібних мавп (і rhGRO $\alpha$ , середнє  $\pm$  середньоквадратичне відхилення)

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

Таблиця 18

143B03	SEQ ID NO.192	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTC AGTACCTACTGGATGTATTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGG GCTCGACTGGGTCTCAGCTATTAATGCTGGTGGTGATAGCACAT ACTATGCAGACCCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC AACAACAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAACC TGAGGACACGGCCCTGTATTACTGTGCGACCGTACGAGGCACA GCTCGTGACTTGGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCG TCTCCTCA
139D05	SEQ ID NO.193	GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCACTCTCTGGAAGGATCGGC AGTATCAACGCCATGGGCTGGTATCGCCAGGTTTCAGGACAACA GCGCGAGTTGGTGCAGTAAGCAGGAGCGGAGGTAGCACAGAC ATTGCTGACTCCGTCGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAA CGGCAAGAACACAGTGTATCTGCAGATGGACAGCCTGAAACCTG AGGACACGGCCGTCTATTACTGTTATGCTCATACTTCAAGCTATA GTAATTGGCGAGTCTACAATAACGACTACTGGGGCCAGGGGACC CAGGTCACCGTCTCCTCA

146A06	SEQ ID NO.194	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTTACCTGTGCAGCCTCTGGACGCATCGG CACTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAG CAGCGCGAGTTGGTCGCAGTTATTACTAGTGGTGGTAGGATAGA CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA ATGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCT GAGGACACGGCCGTCTATTACTATAATGTAGAAACGGTAGTGGG TGCCGTCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
147A01	SEQ ID NO.195	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGGATGGG CAATATCAATGCCATGGGCTGGTATCGCCAGGCTCCAGGGAAGG AGCGCGAGTTGGTCGAAAAATTACTAGGGGTGGTGCATAACC TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCGCCAGAGACAA TATTCTGAACACGGCGTATCTGCAAATGAACGACCTGAAACCTGA GGACACGGCCGTCTATTATTATAATGTAGATGGGGGGCCAGTC AAAATACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
145C09	SEQ ID NO.196	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTC GATGATTATGCCATAGGCTGGTTCGCCAGGCCCCAGGGAAGG AGCGTGAGAGGGTCTCATGTATTAGTGGTAGTGATGGTAGCACA TACTATGCAGACTCCGTCAAGGGCCGATTACCATCTCCAGTGA CAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAAC CCGAGGACACGGCCGTTTATTATTGTGCAGCATATTGGGGACTA ACGCTCAGGCTATGGATGCCCCCCCACCGGTATGACTACTGGG GCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
145D03	SEQ ID NO.197	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGCCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTTATCTTC AGACTCAGTGGCATGGCCTGGTATCGCCAGGCTCCGGGGAGGC AGCGCGAGTGGGTCGCAGTGCTTACCAAAGATGGTACCCTACAC TATGCAGACCCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAAACAA CGCCGAGAACACGTGGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG AGGACACAGCCATCTATTACTGTAATACGGGGCCGTTACTGGGGC CAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
144D01	SEQ ID NO.198	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAACCATCGG CACGATCAGAGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAG CAGCGCGAGTTGGTCGCATTGATTACTAGTACTGGTAGGATAAA CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATTTGAAGAGACA ATGCCAAGAACACGGCGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAACCT GAGGACACGGCCGTCTATTACTATAATATCGAAACACTACGACGT AACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
139H02	SEQ ID NO.199	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTT AGTAACTATGCCATGGGCTGGTTCGCCAGGCCACAGGGAAGG AGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTAAACAAGAGTGGTGGGAACACA CACTATGCAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTAGGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCGTCGCGGACTAAC CCTAAGCCTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA



139A08	SEQ ID NO.200	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTG GGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCTCCTTC AGTCGAGTGCCATGGGCTGGCTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG AGCGTGAATTTGTAGCAGGTATTAGCTGGGGTGGTGATAACTCA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CAACGCCAAGAACACCGTGTCTCTACAAATGAACAGCCTGAAAC CTCAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAAGATACCGGGGA GGCGCGGCAGTAGCTGGTTGGGAGTACTGGGGCCAGGGGACC CAGGTACCGTCTCCTCA
137A08	SEQ ID NO.201	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACTTTG GCCTATTATACCGTAGGCTGGTTCCGCCGGGCCCCAGGGAAGG AGCGCGAGGGGATCTCATGTATTAGTAGTAGTGATGGTAGCACA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CAATGCCAAGAATACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGGCTGACAGACGTACC GACTGTAAAAAGGGTAGAGTCGGTTCTGGTTCTGGGGCCAGG GGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
143A05	SEQ ID NO.202	AAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGGCT GGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGACGCGCCT TCAATTACTATGTATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCAAGGGAAG GAGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTAGCACGCGTGGTAGTATGAC AAAGTATTCAGACTCCGTGCAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG ACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCACATGAACAGCCTGAAA CCTGAGGATACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAGACCCTCGCGG CAGTAGCTGGTCATTTTCGTCCGGGGGTTATGACTACTGGGGCC AGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
137B07	SEQ ID NO.203	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTGTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGAATCATCTTC AGACTCAGTGCGTTGGGTTGGACACGCCAGGCTCCAGGAAAGG CGCGCGAGTGGGTGCGAGGTATTAACAGTGATGGTACGACCAA CTACGCCGACCCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA ACGCCAAGAACACGATATATCTGCACATGGACATGCTGAAACCT GAGGATACGGCCGTCTATTACTGTGCCTCCGGAAAGTACCGGG GCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
127D01	SEQ ID NO.204	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGAGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCACCTTC GATTTCAAAGTCATGGGCTGGTACCGCCAGCCTCCAGGGAAGCA GCGCGAGGGGGTTCGAGCGATTAGGCTTAGTGGTAACATGCAC TATGCAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAAAGCCAA CGCCAAGAACACAGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTG AGGACACGGCCGTCTATTACTGTAAGGTGAACATTCGGGGCCAG GACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA

126B11	SEQ ID NO.205	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGACGCTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAAGCTCCTTC AGAATCAATACCATGGGCTGGTACCGCCGGGCTCCAGGGAAGC AGCGCGAGTTGGTTCGCAGCTCGTGATAGAGGTGGTTACATAAAC TATGTAGATTCCGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAA CGCCAAGCCCAATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG AGGACACGGCCGTCTATTATTGTCTATGCCGGGACCCAAAGATCGG ACGGGTCTGGAATTTGACCACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCA CCGTCTCCTCA
097A09	SEQ ID NO.206	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGAAGCATCGTC AGAATTAATACCATGGGCTGGTACCGCCAGACTCCAGGGAAGCA GCGCGAGTTGGTTCGCAGATATTACAGTGGTGGTAACATAAACT ATATAGACGCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAC ACCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGA GGACACGGCCGTCTATTACTGTAAATGCAGAGATCGTTGTTCTGG TGGGAGTTTGGACCCAGCGTGC GCGGACCGGCAACTACTGGGG CCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
159B10	SEQ ID NO.207	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACGTTT AGTAGCTTGTCCATGGGCTGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGG AGCGTGCCCTTTGTAGCAGCGCTTACTCGAAATGGTGGTTACAGA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CGTCGCCAAGAAGACCTTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCAGATAGTCTTAGT GGTAGTGACTACTTAGGAACCAACCTAGACTACTGGGGCCAGGG GACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
163D02	SEQ ID NO.208	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTG GGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTC AGTAGCTATGCCATGGGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG AGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTACGTGGAATGGTGGTAGAGTA TTTTATACTGCCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CAACGCCAAGAACACGATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAGATAAAGACAGA CGTACTGACTATCTAGGGCACCCCGTTGCCTACTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
163E03	SEQ ID NO.209	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCCTG GGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGACGCATCTTC AGTAGCAATGCCATGGGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG AGCGTGAGTTTGTAGCGGCCATTACCTGGAGGAGTGGCGGTAG CGCGTACTATGCAGACTCCGCGAAGGGCCGATTACCATCTCCA GAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATTTGCAAATGAACAGCCTG AAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTATTGTGCAGCTGGTGGTAG TTCCTGGTTAAGTTTTCCGCCGGAAGTACTGGGGCCAGGGGACCC AGGTCACCGTCTCCTCA

Таблиця 18

2B2	SEQ ID NO.210	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGAGTTGGTGCAGCCG GGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTT AACTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAG CAGCGCGAGTTGGTAGTCCGTAGGACTAGGGGTGGTAGTACAA CGTATCAAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCGCAGAC ATTGCCAAGAAAACGATGTATCTCAAATGAACAGCCTGAAACCT GAAGACACGGCCGTCTATTACTGTATGCTAGATGACCGTGGGGG TGTCTACTGGGGTCAGGGGACCCAGGTACCCGTCTCCTCA
54B12	SEQ ID NO.211	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGACGCTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAAGCACCTTC AGAATCAATACCATGGGCTGGTACCGCCGGGCTCCAGGGAAGC AGCGCGAGTTGGTCCGAGCTCGTGATAGAGGTGGTTACATAAAC TATGTAGATTCCGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAA CGCCAAGCCCACAATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG AGGACACGGCCGTCTATTATTGTATGCCGGGACCCAAAGATCGG ACGGGTCCGAATTTGACCGCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCA CCGTCTCCTCA

Таблиця 19

Основна панель антитіл – CDR +FR CXCR2, пронумерованих за Kabat

	Каркасна область 1	CDR1	Каркасна обл. 2	CDR2	Каркасна область 3	CDR3	Каркасна обл. 4
143B03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS SEQ ID NO. 70	TYMY SEQ ID NO. 246	WVRQAPGKGLDWS S SEQ ID NO. 91	AINAGDSTYYADPV KG SEQ ID NO. 152	RFTISRDNKNTLYLQMNSLK PEDTALYYCAT SEQ ID NO. 111	VRGTARDLDY SEQ ID NO. 172	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
139D05	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CALSGRIGS SEQ ID NO. 71	INAMG SEQ ID NO. 248	WYRQVSGGQRELVA A SEQ ID NO. 92	VSRSGGSTDIADSVK G SEQ ID NO. 153	RFTISRDNKNTVYLQMNSLK 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	WFRQAPGKERERVS S SEQ ID NO. 93	CISGSDGSTYYADSV KG SEQ ID NO. 154	RFTISRDNKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 113	YWGLTLRLWMPHRYDY SEQ ID NO. 174	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
145D03	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGLIFR SEQ ID NO. 73	LSGMA SEQ ID NO. 135	WYRQAPGRQREWVA A SEQ ID NO. 94	VLTKDGLHYADPVK G SEQ ID NO. 155	RFTISRDNKNTVYLQMNSLK 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	WFRQATGKEREFVA A SEQ ID NO. 95	AINKSGGNTHYAGSV KG SEQ ID NO. 156	RFTISRDNKNTVYLQMNSLK 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	WLRQAPGKEREFVA A SEQ ID NO. 96	GISWGGDNSYYADSV KG SEQ ID NO. 157	RFTISRDNKNTVSLQMNSLK PDQTAIVYYCAA 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	WFRRAPGKEREGIS S SEQ ID NO. 97	CISSSDGSTYYADSV KG SEQ ID NO. 158	RFTISRDNKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 117	DRRTDCKKGRVSGSGS SEQ ID NO. 178	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
143A05	KVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRAFN SEQ ID NO. 77	YYVMA SEQ ID NO. 139	WFRQAGKEREFVA A SEQ ID NO. 98	AISTRGSNTKYSDSV QG SEQ ID NO. 159	RFTISRDNKNTVYLHMNSLK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 118	DPRGSSWSFSSGGYDY SEQ ID NO. 179	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
137B07	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CVASGIIFR SEQ ID NO. 78	LSALG SEQ ID NO. 140	WTRQPGKAREWVA A SEQ ID NO. 99	GINSDDTNYADPVK G SEQ ID NO. 160	RFTISRDNKNTIYLHMDMLK PEDTAVYYCAS SEQ ID NO. 119	CKY SEQ ID NO. 180	RQGTQVTVSS SEQ ID NO. 132
127D01	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGSTFD SEQ ID NO. 79	PKVMG SEQ ID NO. 141	WYRQPPGKQREGVA A SEQ ID NO. 100	AIRLSGNMHAESVK G SEQ ID NO. 161	RFTISKANAKNTVYLQMNSLR PEDTAVYYCKV SEQ ID NO. 120	NIRGQDY SEQ ID NO. 181	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
126B11	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAVSGSSFR SEQ ID NO. 80	INTMG SEQ ID NO. 142	WYRRAPGKQRELVA A SEQ ID NO. 101	ARDRGYINVDVSK G SEQ ID NO. 162	RFTISRDNKNTMYLQMNSLK PEDTAVYYCHA SEQ ID NO. 121	GTQDRTRGNFDH SEQ ID NO. 182	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
097A09	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	INTMG	WYRQTPGKQRELVA	DITSGGNINYIDAVK	RFTISRDNKNTVYLQMNSLK	EIVVLVGVWTRARTGNY	WGQGTQVTVSS

## Основна панель антитіл – CDR +FR CXCR2, пронумерованих за Kabat

	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 CAASGRITFS SEQ ID NO. 82	SLSMG SEQ ID NO. 144	WFRQAPGKERAFV A SEQ ID NO. 103	ALTNRNGGYRYADSV KG SEQ ID NO. 164	RFTISRDKVAKTLYLQMNLSK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 123	DSLGSGLDYLGTNDLY SEQ ID NO. 184	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
163D02	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRITFS SEQ ID NO. 83	DYAMG SEQ ID NO. 145	WFRQAPGKEREFV A SEQ ID NO. 104	AITWNGGRVFTASV KG SEQ ID NO. 165	RFTISRDNKNTMYLQMNLSK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 124	DKDRRTDYLGHFVAY 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	RFTISRDNKNTMYLQMNLSK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 125	GGSSWLSFPDPY SEQ ID NO. 186	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
002B02	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGSILT SEQ ID NO. 85	INAMG SEQ ID NO. 147	WYRQAPGKQREL V SEQ ID NO. 106	RRTRGGSTTYQDSVK G SEQ ID NO. 167	RFTISADIAKKTMYLQMNLSK PEDTAVYYCML SEQ ID NO. 126	DDRGVY SEQ ID NO. 187	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
146A06	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLT CAASGRITG SEQ ID NO. 86	INAMG SEQ ID NO. 148	WYRQAPGKQREL V SEQ ID NO. 107	VITSGGRIDYADSVK G SEQ ID NO. 168	RFTISRDNKNTMYLQMNLSK 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	WYRQAPGKQREL V SEQ ID NO. 108	KITRGGAITYADSVK G SEQ ID NO. 169	RFTIARDNLIANTAYLQMNLSK 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	WYRQAPGKQREL V SEQ ID NO. 109	LITSTGRINYADSVK G SEQ ID NO. 170	RFTISRDNKNTMYLQMNLSK PEDTAVYYNI SEQ ID NO. 129	ETLRRNY SEQ ID NO. 190	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
054B12	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAVSGSTFR SEQ ID NO. 89	INTMG SEQ ID NO. 151	WYRQAPGKQREL V SEQ ID NO. 110	ARDRGGYNYADSVK G SEQ ID NO. 171	RFTISRDNKNTMYLQMNLSK PEDTAVYYCHA SEQ ID NO. 130	GTQDRTGRNFD SEQ ID NO. 191	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131

## 21. Оптимізація послідовності – Поліпептиди-антагоністи CXCR2

Аналіз на тепловий зсув (TSA): 5 мкл очищеного одновалентного нанотіла (80 мг/мл) змішували з 5 мкл флуоресцентного зонда Sypro Orange (Invitrogen, Carlsbad, CA, catalogue # S6551) (кінцева концентрація 10x) в 10 мкл буферу (100 мМ фосфату, 100 мМ борату, 100 мМ цитрату, 115 мМ NaCl, забуферені при різних pH від 3,5 до 9). Потім зразки нагрівали у обладнанні LightCycler 480II (Roche, Basel, Switzerland) від 37 °C до 90 °C зі збільшенням 4,4 °C/сек, після чого, ці зразки проохолоджували до 37 °C зі збільшенням 2,2 °C/сек. Після термоіндукованого розгортання білків, гідрофобні "петчі" цих білків обробляли зондом Sypro Orange, з яким зв'язуються ці білки, що приводило до підвищення інтенсивності флуоресценції. Точка перегину першої похідної кривої інтенсивності флуоресценції відповідала температурі плавлення (T<sub>m</sub>). (Ericsson et al. 2006 (Annals of Biochemistry, 357: 289-298).

Диференціальна скануюча калориметрія (DSC): Експерименти проводили на устаткуванні Auto-Cap VP-DSC (MicroCal - GE Healthcare) відповідно до інструкцій виробників. Визначення температури плавлення нанотіла (0,25 мг/мл) здійснювали при швидкості нагрівання 1 °C/хвил. та при температурі в межах від 30 °C до 95 °C. Кінцеві термограми одержували після власного вирахування фонових значень. Після детектування піку за допомогою комп'ютерної програми (Origin 7.0) одержували відповідні температури плавлення.

Окиснення в умовах стресу: Зразки нанотіла (1 мг/мл) обробляли 10 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у PBS протягом чотирьох годин при кімнатній температурі та у темряві, та паралельно обробляли контрольні зразки, але за відсутності H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, а потім буфер перемикали на PBS на знесолюючих центрифужних колонках Zeba (0,5 мол) (Thermo Scientific). Зразки, отримані в умовах стресу, та контрольні зразки аналізували за допомогою ОФХ на встаткуванні Series 1200 (Agilent Technologies) з колонкою Zorbax 300SB-C3 (Agilent Technologies) при 70 °C. Окиснення нанотіла кількісно оцінювали шляхом визначення % площі піка від попередньо визначених піків, що утворюються в результаті окисного стресу, у порівнянні з головним піком білку.

## Оптимізація послідовності 2B2

Білкову послідовність батьківського 2B2 зіставляли шляхом вирівнювання послідовності VH3-23 людини (DP-47) та зародкової лінії JH5 (таблиця 20, сторінка 147). Відмінності у амінокислотах зазначеної послідовності у порівнянні з послідовністю зародкової лінії людини позначені буквами, а ідентичні амінокислоти показані точками. Послідовності з підкресленими відмінностями в амінокислотах відбирали для їхнього перетворення у людський аналог, а інші послідовності залишалися незмінними.

Очищену одновалентну сполуку одержували з 2B2, CXCR20059 та CXCR20063, а потім охарактеризовували у FACS-аналізі на лігандне конкурування та в аналізі на індукване агоністом вивільнення внутрішньоклітинного кальцію (FLIPR) для CXCR2 людини та собакоподібних мавп. Крім того, температуру плавлення цих варіантів визначали в аналізі на тепловий зсув (TSA) або за допомогою диференціальної скануючої калориметрії (DSC) (таблиця 21). M93 L-мутація у CXCR20059 та CXCR20063 елімінує чутливість батьківського 2B2 до окиснення в умовах стресу.

Таблиця 21

Функціональна характеристика одновалентного 2B2 та його варіантів  
з оптимізованою послідовністю

	T <sub>m</sub> (°C)	FACS-аналіз на конкурування з hGro-α, IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
2B2	73,7	1,3×10 <sup>-09</sup>	3,5×10 <sup>-08</sup>	6,5×10 <sup>-07</sup>	2,4×10 <sup>-05</sup>
CXCR20059	73,4	1,5×10 <sup>-09</sup>	1,9×10 <sup>-08</sup>	3,9×10 <sup>-07</sup>	1,9×10 <sup>-05</sup>
CXCR20063	71,9	nd	5,4×10 <sup>-08</sup>	6,1×10 <sup>-06</sup>	2,4×10 <sup>-05</sup>

#### Оптимізація послідовності 97A9

Білкову послідовність батьківського 97A9 зіставляли шляхом вирівнювання послідовності людського VH3-23 (DP-47) та зародкової лінії JH5 (таблиця 22). Відмінності у амінокислотах зазначеної послідовності у порівнянні з послідовністю зародкової лінії людини позначені буквами, а ідентичні амінокислоти показані точками. Послідовності з підкресленими відмінностями у амінокислотах відбирали для їхнього перетворення у людський аналог, а інші послідовності залишалися незмінними.

Очищену одновалентну сполуку одержували з 97A9 та CXCR20061, а потім охарактеризовували у FACS-аналізі на лігандне конкурування та у аналізі на індуковане агоністом вивільнення внутрішньоклітинного кальцію (FLIPR) для CXCR2 людини та собакоподібних мавп. Крім того, температуру плавлення цих варіантів визначали у аналізі на тепловий зсув (TSA) (таблиця 23).

Таблиця 23

Функціональна характеристика одновалентного 97A9 та його  
варіантів з оптимізованою послідовністю

	T <sub>m</sub> (°C)	FACS-аналіз на конкурування з hGro-α, IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
ID		hCXCR2 ctrl	cCXCR2 ctrl	hCXCR2	cCXCR2
97A9	76,5	1,2×10 <sup>-08</sup>	6,3×10 <sup>-08</sup>	9,4×10 <sup>-08</sup>	8,0×10 <sup>-07</sup>
CXCR20061	80,2	1,5×10 <sup>-08</sup>	6,2×10 <sup>-08</sup>	6,6×10 <sup>-08</sup>	3,5×10 <sup>-07</sup>

#### Оптимізація послідовності 163E3

Білкову послідовність батьківського 163E3 зіставляли шляхом вирівнювання послідовності людського VH3-23 (DP-47) та зародкової лінії JH5 (таблиця 24, сторінка 147). Відмінності у амінокислотах зазначеної послідовності у порівнянні з послідовністю зародкової лінії людини позначені буквами, а ідентичні амінокислоти показані точками. Послідовності з підкресленими відмінностями у амінокислотах відбирали для їхнього перетворення у людський аналог, а інші послідовності залишалися незмінними.

Очищену одновалентну сполуку одержували з 163E3 та CXCR20076, а потім охарактеризовували у FACS-аналізі на лігандне конкурування та у аналізі на індуковане агоністом вивільнення внутрішньоклітинного кальцію (FLIPR) для CXCR2 людини та собакоподібних мавп. Крім того, температуру плавлення цих варіантів визначали в аналізі на тепловий зсув (TSA) (таблиця 25).

Таблиця 25

Функціональна характеристика одновалентного 163E3 та його варіантів  
з оптимізованою послідовністю

	T <sub>m</sub> (°C)	FACS-аналіз на конкурування з hGro-α, IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
163E3	74,4	1,0×10 <sup>-08</sup>	2,2×10 <sup>-08</sup>	3,5×10 <sup>-08</sup>	1,5×10 <sup>-07</sup>
CXCR20076	77,3	1,6×10 <sup>-08</sup>	2,5×10 <sup>-08</sup>	3,1×10 <sup>-08</sup>	1,0×10 <sup>-07</sup>

## Оптимізація послідовності 127D1

Білкову послідовність батьківського 127D1 зіставляли шляхом вирівнювання послідовності людського VH3-23 (DP-47) та зародкової лінії JH5 (таблиця 26, сторінка 147). Відмінності у амінокислотах зазначеної послідовності у порівнянні з послідовністю зародкової лінії людини позначені буквами, а ідентичні амінокислоти показані точками. Послідовності з підкресленими відмінностями у амінокислотах відбирали для їхнього перетворення у людський аналог, а інші послідовності залишалися незмінними.

Очищену одновалентну сполуку одержували з 127D1 та CXCR20079, а потім охарактеризовували у FACS-аналізі на лігандне конкурування та у аналізі на індуковане агоністом вивільнення внутрішньоклітинного кальцію (FLIPR) для CXCR2 людини та собакоподібних мавп. Крім того, температуру плавлення цих варіантів визначали в аналізі на тепловий зсув (TSA) (таблиця 27). M57 R-мутація у CXCR20079 елімінує чутливість батьківського 127D1 до окиснення в умовах стресу.

Таблиця 27

## Функціональна характеристика одновалентного 127D1 та його варіантів з оптимізованою послідовністю

	T <sub>m</sub> (°C)	FACS-аналіз на конкурування з hGro- $\alpha$ , IC <sub>50</sub> (M)		FLIPR hGro- $\alpha$ IC <sub>50</sub> (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
127D1	67,2	$5,5 \times 10^{-10}$	$6,1 \times 10^{-09}$	$1,5 \times 10^{-08}$	$1,1 \times 10^{-06}$
CXCR20079	68,6	$8,0 \times 10^{-10}$	$2,8 \times 10^{-09}$	$1,0 \times 10^{-08}$	$4,5 \times 10^{-07}$

## Оптимізація послідовності 163D2

Білкову послідовність батьківського 163D2 зіставляли шляхом вирівнювання послідовності людського VH3-23 (DP-47) та зародкової лінії JH5 (таблиця 28, сторінка 148). Відмінності у амінокислотах зазначеної послідовності у порівнянні з послідовністю зародкової лінії людини позначені буквами, а ідентичні амінокислоти показані точками. Послідовності з підкресленими відмінностями у амінокислотах відбирали для їхнього перетворення у людський аналог, а інші послідовності залишалися незмінними.

Очищену одновалентну сполуку одержували з 163D2 та CXCR20086, а потім охарактеризовували у FACS-аналізі на лігандне конкурування та у аналізі на індуковане агоністом вивільнення внутрішньоклітинного кальцію (FLIPR) для CXCR2 людини та собакоподібних мавп. Крім того, температуру плавлення цих варіантів визначали у аналізі на тепловий зсув (TSA) (таблиця 29).

Таблиця 29

## Функціональна характеристика одновалентного 163D2 та його варіантів з оптимізованою послідовністю

	T <sub>m</sub> (°C)	FACS-аналіз на конкурування з hGro- $\alpha$ , IC <sub>50</sub> (M)		FLIPR hGro- $\alpha$ IC <sub>50</sub> (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
163D2	70,7	$2,8 \times 10^{-09}$	$7,1 \times 10^{-09}$	$6,6 \times 10^{-08}$	$9,2 \times 10^{-08}$
CXCR20086	72,3	$2,0 \times 10^{-09}$	$4,8 \times 10^{-09}$	$7,3 \times 10^{-08}$	$8,5 \times 10^{-08}$

## Оптимізація послідовності 54B12

Білкову послідовність батьківського 54B12 зіставляли шляхом вирівнювання послідовності людського VH3-23 (DP-47) та зародкової лінії JH5 (таблиця 30). Відмінності у амінокислотах зазначеної послідовності у порівнянні з послідовністю зародкової лінії людини позначені буквами, а ідентичні амінокислоти показані точками. Послідовності з підкресленими відмінностями у амінокислотах відбирали для їхнього перетворення у людський аналог, а інші послідовності залишалися незмінними.

Очищену одновалентну сполуку одержували з 54B12, CXCR20103 і CXCR2104, а потім охарактеризовували у FACS-аналізі на лігандне конкурування та у аналізі на індуковане агоністом вивільнення внутрішньоклітинного кальцію (FLIPR) для CXCR2 людини та собакоподібних мавп. Крім того, температуру плавлення цих варіантів визначали в аналізі на тепловий зсув (TSA) (таблиця 31).

Таблиця 31

Функціональна характеристика одновалентного 54B12 та його варіантів  
з оптимізованою послідовністю

	T <sub>m</sub> (°C)	FACS-аналіз на конкування з hGro-α, IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
		hCXCR2 ctrl	cCXCR2 ctrl	hCXCR2	cCXCR2
54B12	64,4	nf*	3,3×10 <sup>-08</sup>	1,5×10 <sup>-07</sup>	1,1×10 <sup>-06</sup>
CXCR20104	tbd	nf*	1,3×10 <sup>-08</sup>	5,9×10 <sup>-8</sup>	3,5×15 <sup>-6</sup>

Таблиця 20

Вирівнювання послідовності наноантитіла 2B2 і його варіантів з оптимізованою послідовністю

Kabat#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	101	110
VH3-23/JH5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVS	AISSGGSTYYADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	-----	WGQGLTVTVSS						
CXCR22B2	..V..E..	..SILTIN..G.Y..	..QR.L.VRRT-R..	T.Q..	..A.IA.K.M..	..KP..	..MLDDRGGVY..	..Q..			
CXCR20059	..V..E..	..SILTIN..G.Y..	..QR.L.VRRT-R..	T.Q..	..A.I..K.M..	..P..	..MLDDRGGVY..	..Q..			
CXCR20063	..V..E..	..SILTIN..G.Y..	..QR.L.VRRT-R..	T.Q..	..A.I..K.M..	..P..	..MLDDRGGVY..	..Q..			

VH3-23/JH5 - SEQ ID NO. 212

Таблиця 22

Вирівнювання послідовності наноантитіла 97A9 і його варіантів з оптимізованою послідовністю

Kabat#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
VH3-23/JH5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVS	AISSGGSTYYADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	-----	WGQGLTVTVSS						
CXCR297A9	..V..	..SIVRINT..G.Y..	..QR.L.AD.T..	NIN.I.A..	..T..V..	..KP..	..NABIVVLGVWVTQARTGNY..	..Q..			
CXCR20061	..V..	..SIVRINT..G.Y..	..QR.L.AD.T..	NIN.I.A..	..T..V..	..P..	..NABIVVLGVWVTQARTGNY..	..Q..			

Таблиця 24

Вирівнювання послідовності наноантитіла 163E3 і його варіантів з оптимізованою послідовністю

Kabat#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
VH3-23/JH5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVS	AISSGGSTYYADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	-----	WGQGLTVTVSS						
CXCR2163E3	..V..	..RI..N..G.F..	..ER.F.A..TWR..	A..A..	..A..V..	..KP..	..AGGSSWLSFPDPY..	..Q..			
CXCR20076	..V..	..RI..N..G.F..	..ER.F.A..TWR..	A..A..	..V..	..P..	..AGGSSWLSFPDPY..	..Q..			

5

Таблиця 26

Вирівнювання послідовності наноантитіла 127D1 і його варіантів з оптимізованою послідовністю

Kabat#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	101	110
VH3-23/JH5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVS	AISSGGSTYYADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	-----	WGQGLTVTVSS						
CXCR2127D1	..V..	..A.E..	..S..DFKV..G.Y..	..P..QR.G.A..R-LS.NMH..E..	..KA.A..V..	..P..	..KVNIRGQDY..	..Q..			
CXCR20079	..V..	..A.E..	..S..DFKV..G.Y..	..P..QR.G.A..R-LS.NRH..E..	..A..V..	..P..	..KVNIRGQDY..	..Q..			

Таблиця 28

Вирівнювання послідовності наноантитіла 163D2 і його варіантів з оптимізованою послідовністю

Kabat#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
VH3-23/JH5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVS	AISSGGSTYYADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	-----	WGQGLTVTVSS						
CXCR2163D2	..V..	..A.E..	..R..D..G.F..	..ER.F.A..TWN..RVF.TA..	..A..M..	..KP..	..ADKDRRTDYLGHFPVAY..	..Q..			
CXCR20086	..V..	..A.E..	..R..D..G.F..	..ER.F.A..TWN..RVF.TA..	..A..M..	..P..	..ADKDRRTDYLGHFPVAY..	..Q..			





Таблиця 34

Амінокислотні послідовності варіантів з оптимізованою послідовністю та батьківських наноантитіл, включаючи дані про CDR (Kabat) і каркасні області

	Каркасна область 1	CDR1	Каркасна область 2	CDR2	Каркасна область 3	CDR3	Каркасна обл. 4
<b>CXCR20059</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIT SEQ ID NO. 229	INAMG SEQ ID NO. 147	WYRQAPGKQRELVV SEQ ID NO. 106	RRTGGSTTYQDSVKG SEQ ID NO. 167	RFTISADISKNTMYLQMNSL RPEDTAVYYCCLL SEQ ID NO. 238	DDRGGVY SEQ ID NO. 187	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
<b>CXCR20063</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIT SEQ ID NO. 229	INAMG SEQ ID NO. 147	WYRQAPGKQRELVV SEQ ID NO. 106	RRTGGSTTYQDSVKG SEQ ID NO. 167	RFTISADISKNTMYLQMNSL RPEDTAVYYCCLL SEQ ID NO. 239	DDRGGVY SEQ ID NO. 187	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
<b>002B02</b>	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIT SEQ ID NO. 85	INAMG SEQ ID NO. 147	WYRQAPGKQRELVV SEQ ID NO. 106	RRTGGSTTYQDSVKG SEQ ID NO. 167	RFTISADIAKNTMYLQMNSL KPEDTAVYYCML SEQ ID NO. 126	DDRGGVY SEQ ID NO. 187	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
<b>CXCR20061</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIVR SEQ ID NO. 230	INTMG SEQ ID NO. 143	WYRQAPGKQRELVA SEQ ID NO. 109	DITSGGNINYADSVKG SEQ ID NO. 235	RFTISRDNKNTVYLQMNSL RPEDTAVYYCNA SEQ ID NO. 240	EIVVLVGWVTQRARTGNY SEQ ID NO. 183	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
<b>097A09</b>	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAGSIVR SEQ ID NO. 81	INTMG SEQ ID NO. 143	WYRQTPGKQRELVA SEQ ID NO. 102	DITSGGNINYIDAVKG SEQ ID NO. 163	RFTISRDNKNTVYLQMNSL KPEDTAVYYCNA SEQ ID NO. 122	EIVVLVGWVTQRARTGNY SEQ ID NO. 183	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 133
<b>CXCR20079</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFD SEQ ID NO. 231	FKVMG SEQ ID NO. 141	WYRQAPGKQREGEVA SEQ ID NO. 247	AIRLSGNRHYAESVKG SEQ ID NO. 236	RFTISRANSKNTVYLQMNSL RPEDTAVYYCKV SEQ ID NO. 241	NIRGQDY SEQ ID NO. 181	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
<b>127D01</b>	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFD SEQ ID NO. 79	FKVMG SEQ ID NO. 141	WYRQPPGKQREGEVA SEQ ID NO. 100	AIRLSGNRHYAESVKG SEQ ID NO. 161	RFTISKANAKNTVYLQMNSL RPEDTAVYYCKV SEQ ID NO. 120	NIRGQDY SEQ ID NO. 181	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
<b>CXCR20076</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFS SEQ ID NO. 232	SNAMG SEQ ID NO. 146	WFRQAPGKEREFEVA SEQ ID NO. 105	AITWRSGGSAYYADSVKG SEQ ID NO. 237	RFTISRDNKNTVYLQMNSL RPEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 242	GGSSWLSFPPDY SEQ ID NO. 186	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
<b>163B03</b>	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAGSIFRS SEQ ID NO. 84	SNAMG SEQ ID NO. 146	WFRQAPGKEREFEVA SEQ ID NO. 105	AITWRSGGSAYYADSAKG SEQ ID NO. 166	RFTISRDNKNTVYLQMNSL KPEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 125	GGSSWLSFPPDY SEQ ID NO. 186	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
<b>CXCR20086</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFS SEQ ID NO. 233	DYAMG SEQ ID NO. 145	WFRQAPGKEREFEVA SEQ ID NO. 104	AITWNGRGRVFTASVKG SEQ ID NO. 165	RFTISRDNKNTVYLQMNSL RPEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 243	DKDRRTDYLGHVPVAY SEQ ID NO. 185	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
<b>163D02</b>	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFS SEQ ID NO. 83	DYAMG SEQ ID NO. 145	WFRQAPGKEREFEVA SEQ ID NO. 104	AITWNGRGRVFTASVKG SEQ ID NO. 165	RFTISRDNKNTVYLQMNSL KPEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 124	DKDRRTDYLGHVPVAY SEQ ID NO. 185	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
<b>CXCR20104</b>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSTFR SEQ ID NO. 234	INTMG SEQ ID NO. 151	WYRQAPGKQRELVA SEQ ID NO. 109	ARDRGYINYYVDSVKG SEQ ID NO. 171	RFTISRDNKPTMYLQMNSL RPEDTAVYYCHA SEQ ID NO. 244	GTQDRTGRNFDR SEQ ID NO. 191	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
<b>054B12</b>	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGSTFR SEQ ID NO. 89	INTMG SEQ ID NO. 151	WYRRAPGKQRELVA SEQ ID NO. 110	ARDRGYINYYVDSVKG SEQ ID NO. 171	RFTVSRDNKPTMYLQMNSL KPEDTAVYYCHA SEQ ID NO. 130	GTQDRTGRNFDR SEQ ID NO. 191	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131

Таблиця 35

Дані для CDR варіантів з оптимізованою послідовністю згідно Chotia

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

## 22. Картування епітопів

Картування епітопів для нанотіл здійснювали як описано у публікації Integral Molecular Inc., 3711 Market street, Suite 900, Philadelphia, PA, USA, [www.integralmolecular.com](http://www.integralmolecular.com) із застосуванням технології мутагенезу методом "дробовика".

Короткий опис технології мутагенезу за методом "дробовика"

При мутагенезі методом "дробовика" застосовується патентована великомасштабна технологія клітинної експресії, яка дозволяє здійснювати експресію та аналіз великих бібліотек мutowаних білків-мішеней в еукаріотичних клітинах. Кожний залишок у білку був мutowаний окремо, звичайно його заміняли багатьма іншими амінокислотами для аналізу зміни функції білку. Білки були експресовані у стандартних клітинних лініях ссавців, таким чином, щоб можна було картувати білки навіть зі складною структурою, трансляція або післятрансляційний процесинг яких повинні відбуватися в еукаріотичних клітинах.

Для картування епітопів використовували наступну номенклатуру:  
RDHBC 792=CXCR20079

RDHBC 793=CXCR20061

RDHBC 792=CXCR20076.

Епітопи для анти-CXCR2 антитіл RD-HBC792 (CXCR20079), RD-HBC793 (CXCR220061) і RD-HBC794 (CXCR20076) картували з розділенням у одну амінокислоту за допомогою мутагенезу методом "дробовика".

Батьківська конструкція: Немічений батьківський ген клонували у вектор з високим рівнем експресії, а потім секвенували та його експресію підтверджували за допомогою імунодетектування. Оптимізація нанотіла: детектування нанотіл було оптимізоване у форматі мутагенезу методом "дробовика" шляхом аналізу панелі розведень нанотіл у 394-лункових мікропланшетах. Оптимальну концентрацію кожного нанотіла відбирали для скринінгу бібліотеки з мутаціями. Після конструювання бібліотеки з мутаціями, амінокислоту у кожному положенні заміняли консервативним та неконсервативним залишком, включаючи заміну кожного залишку на Ala. Цю бібліотеку тестували на поверхневу експресію та скринували із трьома повторностями на зв'язування нанотіла за допомогою імунодетектування. Потім проводили аналіз бібліотеки на втрату здатності нанотіла до зв'язування, ідентифікували ключові залишки та здійснювали картування.

Експресія батьківської конструкції: Імунодетектування тимчасової експресії батьківської конструкції дикого типу здійснювали у 384-лунковому планшеті за допомогою імунолюмінесцентного та імунофлуоресцентного аналізу. У всіх експериментах, стадії обробки рідиною включали трансфекцію клітин, а потім проводили імунологічне забарвлення з використанням роботизованих обладнань для обробки рідиною з метою забезпечення точності результатів та високої відтворюваності експериментів.

Таблиця 36

Експериментальні параметри, використовувані для аналізу батьківської плазмід

Експериментальні параметри	Імунолюмінесценція	Імунофлуоресценція
Клітини	HEK-293T	HEK-293T
Фіксація	4 % PFA	4 % PFA
Блокуючий буфер	10 % козяча сироватка	10 % козяча сироватка
1 МАb, Мішень Концентрація Інкубування # за каталогом виробника	Анти-CXCR2 антитіло 2 мкг/мл, 1 година, R&D Systems MAB331	Анти-CXCR2 антитіло 3 мкг/мл, 1 година, R&D Systems MAB331
2 МАb Мішень Концентрація Виробник # за каталогом	ПХ-кон'юговане антимишаче антитіло, 0,8 мкг/мл Jackson Immunoresearch 115-035-003	антимишаче антитіло Dyelight 549 3,75 мкг/мл Jackson Immunoresearch 115-505-003
Промивання	PBS++	PBS++
Сигнал:фон	29:1	2,2:1
% коефіцієнта мінливості (KM) конструкції по відношенню до батьківської конструкції	4,7 %	12 %

Таблиця 37

Експериментальні параметри, використовувані для імунодетектування поліклонального антитіла

Детектування загальної експресії рецептору клітинної поверхні з використанням поліклональної сироватки. Поліклональну сироватку (здатну реагувати з усіма мутантами) використовували для кількісної оцінки загальної експресії з метою детектування кожного клону у бібліотеці з мутаціями	Експериментальні параметри
Клітини	HEK-293T
Фіксація	4 % PFA
Блокуючий буфер	10 % козяча сироватка
1°PAb	
Мішень Концентрація Інкубування # за каталогом виробника	Анти-CXCR2 антитіло розведення 1:1000 1 година Novus NBP1-49218
2°MAb	
Мішень Концентрація Виробник # по каталогу	ПХ-кон'юговане антикроляче антитіло 0,8 мкг/мл Southern Biotech 4050-05
Промивання	PBS++
Сигнал:фон	17:1
% КМ	10 %

Висновки: Стійку поверхневу експресію та загальну експресію детектували для батьківської конструкції дикого типу з використанням контрольного MAb та поліклональної сироватки для того, щоб таку батьківську конструкцію дикого типу можна було використовувати для мутагенезу методом "дробовика". Імунолюмінесцентний аналіз дає високі результати "сигнал: фон" та низький коефіцієнт мінливості, а тому він може бути використаний у дослідженнях з картування.

Імунодетектування оптимізували з використанням картуємих нанотіл. Імунодетектування здійснювали у 384-лунковому планшеті з використанням клітин, тимчасово трансфікованих тільки рецептором дикого типу або плазмідним вектором. Концентрації для наступних досліджень щодо картування були вибрані виходячи зі значення сигналу, близького до максимального, з високим відношенням "сигнал: фон" та з низькою мінливістю.

Кінцеві умови проведення скринінг-аналізу бібліотеки з мутаціями

Таблиця 38

Експериментальні параметри, використовувані для оптимізованого аналізу за допомогою детектування із застосуванням мутагенезу за методом "дробовика" у 384-лунковому планшеті

Експериментальні параметри	RD-HBC792	RD-HBC793	RD-HBC794
Клітини	HEK-293T	HEK-293T	HEK-293T
Фіксація	4 % PFA	4 % PFA	4 % PFA
Блокуючий буфер	10 % козяча сироватка	10 % козяча сироватка	10 % козяча сироватка
1°MAb Мішень Оптимальна концентрація Інкубування	Анти-CXCR2 антитіло 1,0 мкг/мл 1 година	Анти-CXCR2 антитіло 1,0 мкг/мл 1 година	Анти-CXCR2 антитіло 2,0 мкг/мл 1 година

Таблиця 38

Експериментальні параметри, використовувані для оптимізованого аналізу за допомогою детектування із застосуванням мутагенезу за методом "дробовика" у 384-лунковому планшеті

2°MAb Мішень концентрація інкубування Виробник Назва антитіла	Анти-мус антитіло 2 мкг/мл 1 година Лабораторія Гібридома 9E10	Анти-мус антитіло 2 мкг/мл 1 година Лабораторія Гібридома 9E10	Анти-мус антитіло 2 мкг/мл 1 година Лабораторія Гібридома 9E10
3°MAb Мішень Концентрація Виробник # за каталогом	ПХ-кон'юговане антимішаче антитіло 0,8 мкг/мл Jackson Immunoresearch 115-035-003	ПХ-кон'юговане антимішаче антитіло 0,8 мкг/мл Jackson Immunoresearch 115-035-003	ПХ-кон'юговане антимішаче антитіло 0,8 мкг/мл Jackson Immunoresearch 115-035-003
Промивання	PBS++	PBS++	PBS++
Сигнал:фон	13:1	6,9:1	20:1
% КМ	7,9 %	22 %	13 %

Оптимізовані умови аналізу, певні у даній заявці, використовували для картування бібліотеки для CXCR2 з мутаціями у 384-лунковому планшеті. Кожний клон бібліотеки експресували у клітинах шляхом тимчасової трансфекції та аналізували на реакційну здатність нанотіла приблизно через 18 годин після трансфекції. Анти-CXCR2 нанотіла RD-HBC792, RD-HBC793 та RD-HBC794 не містили Fc-областей, але містили мус-мітку, а тому була застосована багатостадійна стратегія детектування, у якій використовували проміжне мишаче анти-мус антитіло (9E10) з наступним детектуванням з використанням ПХ-кон'югованого антимішачого антитіла.

Висновки: Були визначені кінцеві умови для імунодетектування та картування епітопів для трьох анти-CXCR2 нанотіл. Оптимізовані умови давали високе співвідношення "сигнал: фон" та низьку мінливість при мутагенезі, проведеному за методом "дробовика", а тому вони можуть бути використані для картування епітопів з високою вірогідністю. Картування епітопів включало проведення аналізів у тих же самих умовах, визначених вище, але з використанням бібліотеки варіантів рецепторів з мутаціями.

Ідентифікація ключових залишків епітопів для нанотіл

Таблиця 39

## Ідентифікація ключових залишків

ID Залишку	Мутації	ID Клону	Поліклональне		RD HBC 792		RD HBC 793		RD HBC 794	
			Сер.	Сер. Кв. Відх.	Сер.	Сер. Кв. Відх.	Сер.	Сер. Кв. Відх.	Сер.	Сер. Кв. Відх.
11	F11A	10	39.9	17.0	7.1	2.1	81.1	13.7	81.6	20.6
	F11Y	975	70.5	6.2	26.7	14.7	113.9	5.4	100.2	29.1
14	F14A	486	35.4	5.4	8.4	3.9	98.6	8.7	110.3	5.5
	F14Y	1170	100.2	16.7	53.0	10.0	117.7	46.6	124.9	4.6
15	W15A	116	69.2	2.8	8.4	1.4	125.4	18.6	114.5	13.1
	W15Y	1075	92.3	6.2	14.9	6.4	112.2	27.9	110.8	11.4
39	C39A	95	86.2	6.0	65.0	6.7		7.1		0.7
	C39N	1099	108.7	8.8	94.4	34.9		6.7		4.4
112	W112A	318	88.2	12.9	102.8	28.7		7.4		6.6
	W112Y	1462	109.9	13.6	106.1	25.1	37.1	6.2	39.9	16.1
114	F114A	211	88.9	5.8	73.1	10.6		8.4	33.4	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		5.2		2.2
	G115T	1561	82.4	40.6	89.7	9.8	61.7	14.8	55.6	6.6

## Ідентифікація ключових залишків

188	Y188A	765	89.6	21.2	100.0	37.7	102.8	12.4		6.3
	Y188F	1634	133.8	16.2	106.8	14.2	87.1	31.1	107.2	11.7
196	C196A	963	86.9	16.4	99.9	17.2		7.0		2.4
	C196N	1836	97.9	8.1	90.9	14.3		2.1		3.3
274	D274A	889	101.4	14.9	102.2	1.9		7.0		9.2
	D274E	1955	80.3	20.3	97.5	6.6	52.1	13.2	60.4	14.3
282	I282A	669	79.6	10.7	66.8	17.7		12.2		8.8
	I282N	1989	58.8	9.2	78.5	13.7		18.0		3.1
285	T285A	770	64.8	14.3	53.1	2.4		9.7		13.6
	T285S	2215	154.4	65.9	91.8	23.2	116.4	37.0	121.5	27.0
286	C286A	771	87.3	19.6	57.4	9.6		6.5		2.0
	C286N	2024	92.0	20.9	58.0	13.5		9.3		8.2
293	D293A	778	131.5	4.9	100.8	49.9		8.2	44.9	17.6
	D293E	2127	150.3	23.4	138.9	24.6	73.3	26.5	141.9	19.4

Ключові залишки для MAb ідентифікували шляхом порівняння реактивності клонів нанотіл з реактивністю поліклональних нанотіл (поверхнева експресія). Залишки, що присутні у епітопі для антитіла, були ідентифіковані як залишки, що не зв'язуються з нанотілом, але, що зв'язуються з поліклональним антитілом, включаючи заміну залишком Ala (тобто, видалення бічного ланцюгу залишку), та ці залишки були локалізовані у позаклітинних петлях. Були представлені середні значення реактивності та стандартне відхилення для зв'язування з MAb та для зв'язування з поліклональним антитілом. Ключові залишки, ідентифіковані для кожного MAb, показані сірим кольором. Дані для RD HBC792 також порівнювали з даними для RD HBC793, оскільки було виявлено, що профіль зв'язування з RD HBC792 був аналогічний профілю зв'язування з комерційно доступною поліклональною сироваткою (яка походила від N-кінцевого позаклітинного домену CXCR2 людини, що, імовірно, служить поясненням більш низької реактивності сироватки, що містить мутації F11, F14 і W15).

Додатковий аналіз даних про епітопи

Ключові амінокислоти, ідентифіковані шляхом картування за допомогою мутагенезу методом "дробовика", дозволяють визначити сайт(и) зв'язування із трьома анти-CXCR2 MAb. Карти MAb RD HBC792 для N-кінцевої області CXCR2 та локалізація ключових залишків у безпосередній близькості одного від іншого дозволяють припустити, що цей епітоп за своєю природою є лінійним. MAb RD HBC793 та RD HBC794, мабуть, зв'язуються з конформаційно складним епітопом, утвореним, головним чином, ECL1 та ECL3 рецептору CXCR2. Мутація позаклітинних залишків Cys, які, як відомо, утворюють два дисульфідних містки, що утримують позаклітинні петлі у положенні хемокінових рецепторів, також приводить до елімінації зв'язування MAb 793 та 794, а тому, мабуть, що вони не приймають особистої участі у взаємодії з епітопом. Епітопи для 793 та 794 у значній мірі перекриваються, хоча й мають незначні відмінності.

Варіанти здійснення винаходу

1. Поліпептид, що містить щонайменше два антигензв'язуючих домени імуноглобуліну, де поліпептид спрямований проти хемокінового рецептору CXCR2 або зв'язується із цим рецептором, та де зазначений поліпептид включає перший антигензв'язуючий домен, що розпізнає перший епітоп на CXCR2, та другий антигензв'язуючий домен, що розпізнає другий епітоп на CXCR2.

2. Поліпептид за варіантом здійснення 1, де зазначений перший антигензв'язуючий домен здатний зв'язуватися з лінійним пептидом, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:7, а зазначений другий антигензв'язуючий домен не здатний зв'язуватися із зазначеним лінійним пептидом, або зв'язується із цим пептидом з меншою афінністю.

3. Поліпептид за варіантом здійснення 1 або 2, де зазначений перший антигензв'язуючий домен міститься у одному варіабельному домені першого імуноглобуліну, а зазначений другий антигензв'язуючий домен міститься у одному варіабельному домені другого імуноглобуліну.

4. Поліпептид за варіантом здійснення 3, де щонайменше один із зазначених першого та другого антигензв'язуючих доменів міститься у V<sub>L</sub>-домени антитіла або у його фрагменті.

5. Поліпептид за варіантом здійснення 3, де щонайменше один із зазначених першого та другого антигензв'язуючих доменів міститься у  $V_H$ -доміні антитіла або у його фрагменті.

6. Поліпептид за варіантом здійснення 4 або 5, де зазначений перший антигензв'язуючий домен міститься у  $V_L$ -доміні або у його фрагменті, а зазначений другий антигензв'язуючий домен міститься у  $V_H$ -доміні або у його фрагменті.

7. Поліпептид за варіантом здійснення 4 або 5, де зазначений перший антигензв'язуючий домен міститься у  $V_H$ -доміні або у його фрагменті, а зазначений другий антигензв'язуючий домен міститься у  $V_L$ -доміні або у його фрагменті.

8. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 3-7, де зазначені перший та другий антигензв'язуючі домени містяться у першому та другому доменних антитілах (dAb).

9. Поліпептид за варіантом здійснення 3 або 5, де щонайменше один із зазначених першого та другого антигензв'язуючих доменів міститься у  $V_{HH}$ -доміні або у його фрагменті, що походить від одного важкого ланцюгу антитіла з важким ланцюгом, отриманого від тваринного сімейства верблужих, або у його варіанті з оптимізованою послідовністю, включаючи гуманізований варіант.

10. Поліпептид за варіантом здійснення 9, де кожний із зазначених антигензв'язуючих доменів міститься у  $V_{HH}$ -доміні або у його фрагменті, що походить від одного важкого ланцюгу антитіла з важким ланцюгом, отриманого від тваринного сімейства верблужих, або у його варіанті з оптимізованою послідовністю, включаючи гуманізований варіант.

11. Поліпептид за варіантом здійснення 9 або 10, де кожна у  $V_{HH}$ -послідовність або її фрагмент включають одну, дві або три CDR.

12. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 9-11, де кожна  $V_{HH}$ -послідовність має структуру: FR-CDR-FR-CDR-FR-CDR-FR.

13. Поліпептид за будь-яким з попередніх варіантів здійснення, де зазначені щонайменше два антигензв'язуючих домени зв'язані за допомогою лінкеру.

14. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 3-13, що має структуру: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-лінкер-FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8,

де якщо FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 містить перший антигензв'язуючий домен, тоді FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 містить другий антигензв'язуючий домен, та якщо FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 містить другий антигензв'язуючий домен, тоді FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 містить перший антигензв'язуючий домен.

15. Поліпептид за варіантом здійснення 1 або 2, де кожен із зазначених першого та другого антигензв'язуючих доменів міститься у антитілі з важким ланцюгом.

16. Поліпептид за варіантом здійснення 1 або 2, де зазначений перший антигензв'язуючий домен міститься у одному ланцюзі першого антитіла з важким ланцюгом, а зазначений другий антигензв'язуючий домен міститься у одному ланцюзі другого антитіла з важким ланцюгом, де зазначені перше та друге антитіло з одним важким ланцюгом зв'язані за допомогою лінкеру.

17. Поліпептид за варіантом здійснення 1 або 2, де кожен із зазначених першого та другого антигензв'язуючих доменів міститься у антитілі, що складається із двох важких ланцюгів та двох легких ланцюгів.

18. Поліпептид за варіантом здійснення 1 або 2, де зазначений перший та другий антигензв'язуючі домени містяться у першому та другому антитілах, відповідно, де кожне із цих антитіл містить два важкі та два легкі ланцюги, та де зазначені перше та друге антитіла зв'язані за допомогою лінкеру.

19. Поліпептид за варіантом здійснення 1 або 2, де зазначений перший та другий антигензв'язуючі домени містяться у першому та другому Fab- або F(ab)2-фрагментах антитіла, відповідно, та де зазначені перший та другий Fab- або F(ab)2-фрагменти зв'язані за допомогою лінкеру.

20. Поліпептид за варіантом здійснення 19, де зазначений перший антигензв'язуючий домен міститься у Fab-фрагменті антитіла, а зазначений другий антигензв'язуючий домен міститься у F(ab)2-фрагменті або навпаки.

21. Поліпептид за варіантом здійснення 1 або 2, де зазначений перший та другий антигензв'язуючі домени містяться у першому та другому одноланцюгових Fv (scFv) антитілах або в їхніх фрагментах, відповідно, та де зазначені перший та другий scFvs зв'язані за допомогою лінкеру.

22. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 13, 14, 16, 18, 19, 20 або 21, де лінкер з'єднує С-кінець одного імуноглобуліну, що містить антигензв'язуючий домен, з N-кінцем другого імуноглобуліну, що містить антигензв'язуючий домен.

23. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 13, 14, 16 або 18-22, де лінкером є пептид, що містить амінокислотну послідовність, що не походить від імуноглобуліну.

24. Поліпептид за варіантом здійснення 23, де пептидний лінкер має довжину у 3-50 амінокислот.

25. Поліпептид за варіантом здійснення 24, де число амінокислот у лінкері вибрано з 3-9, 10-15, 16-20, 21-25, 26-35, 36-40, 41-45 або 46-50.

5 26. Поліпептид за варіантом здійснення 24, де лінкер має довжину у 35 амінокислот.

27. Поліпептид за варіантом здійснення 24, де лінкер складається тільки із двох різних амінокислот.

28. Поліпептид за варіантом здійснення 27, де лінкер складається з амінокислот гліцину та серину.

10 29. Поліпептид за варіантом здійснення 27, де лінкер складається з амінокислот проліну та серину, та необов'язково, аланіну.

30. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 23-26, де лінкер складається тільки з аланіну.

15 31. Поліпептид за варіантом здійснення 27, де пептидний лінкер складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:220.

32. Поліпептид за будь-яким з попередніх варіантів здійснення, де зазначений поліпептид включає амінокислотні послідовності CDR, що походять від верблужих антитіл, що мають один важкий ланцюг або відповідають цим антитілам.

20 33. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 9-14, де амінокислотні послідовності каркасних областей походять від верблужих антитіл, що мають один важкий ланцюг або відповідають цим антитілам.

34. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 9-14, де амінокислотні послідовності каркасних областей мають оптимізовану послідовність, включаючи їх гуманізовані варіанти.

25 35. Поліпептид за будь-яким з попередніх варіантів здійснення, який специфічно зв'язується з CXCR2.

36. Поліпептид за будь-яким з попередніх варіантів здійснення, який спрямований проти CXCR2 людини або зв'язується з ним.

30 37. Поліпептид за будь-яким з попередніх варіантів здійснення, що включає щонайменше один додатковий антигензв'язуючий домен, який спрямований проти сироваткового білку або специфічно зв'язується із сироватковим білком.

38. Поліпептид за будь-яким з попередніх варіантів здійснення, де зазначеним сироватковим білком є альбумін сироватки людини.

35 39. Молекула, яка містить щонайменше два поліпептиди, та яка спрямована проти хемокінового рецептору CXCR2 або зв'язується з ним, де перший поліпептид містить перший антигензв'язуючий домен імуноглобуліну, а другий поліпептид містить другий антигензв'язуючий домен імуноглобуліну, де зазначені перший та другий антигензв'язуючі домени розпізнають перший та другий епітопи на CXCR2, та де зазначені щонайменше два поліпептиди зв'язані за допомогою не-пептидного лінкеру.

40 40. Молекула як варіант здійснення за варіантом здійснення 38, де зазначений перший антигензв'язуючий домен має здатність зв'язуватися з лінійним пептидом, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:7, а зазначений другий антигензв'язуючий домен або не зв'язується із зазначеним лінійним пептидом, або зв'язується із цим пептидом з низкою афінності.

45 41. Молекула як варіант здійснення за варіантом здійснення 39 або 40, що має відмітну ознаку, визначену за будь-яким з варіантів здійснення 3-22 та 32-38.

50 42. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 3-14 або 22-39, де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:145, 165 та 185, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:145, 165 або 185, та де зазначений один варіабельний домен першого імуноглобуліну включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:141, 161 та 181, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:141, 161 або 181 (163D2/127D1).

55 43. Поліпептид за варіантом здійснення 42, що має структуру варіанту за варіантом здійснення 14, де в зазначеному одному варіабельному домені другого імуноглобуліну, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:145, CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:165, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:185, та де у зазначеному одному варіабельному домені першого імуноглобуліну, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:141, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID

60



NO:161, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:181.

44. Поліпептид за варіантом здійснення 43, де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80 % ідентичні амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:145, 165, 185, 141, 161 або 181.

5 45. Поліпептид за варіантом здійснення 43 або 44, де амінокислотні послідовності відрізняються від послідовностей SEQ ID NO:145, 165, 185, 141, 161 або 181, тільки консервативними амінокислотними замінами.

46. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 43-45, де каркасні області у кожному мономері одного варіабельного домену містять один або кілька ключових залишків у положеннях амінокислот 11, 37, 44, 46, 47, 83, 84, 103, 104 та 108, пронумерованих за Kabat.

10 47. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 43-46, де FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:83; FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:104; FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:124; FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131; FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:79; FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:100; FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:120 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

15 48. Поліпептид за варіантом здійснення 47, модифікований таким чином, що FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 мають амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80 % ідентичні будь-якій з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:83, 104, 124, 131, 79, 100 або 120.

20 49. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 41-48, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:58, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:58.

25 50. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 42-46, де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:218, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:218, та де зазначений один варіабельний домен першого імуноглобуліну містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:216, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:216.

30 51. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 3-14 або 22-39, де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:146, 166 і 186, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:146, 166 або 188, і де зазначений один варіабельний домен першого імуноглобуліну включає щонайменше одну CDR, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:141, 161 та 181, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:141, 161 або 181 (163E3/127D1).

35 52. Поліпептид за варіантом здійснення 51, що має структуру варіанту за варіантом здійснення 14, де у зазначеному одному варіабельному домені другого імуноглобуліну, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:146, CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:166, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:186, та де у зазначеному одному варіабельному домені першого імуноглобуліну, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:141, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:161, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:181.

45 53. Поліпептид за варіантом здійснення 52, де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80 % ідентичні будь-якій з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:176, 166, 186, 141, 161 або 181.

50 54. Поліпептид за варіантом здійснення 52 або 53, де амінокислотні послідовності відрізняються від послідовностей SEQ ID NO:146, 166, 186, 141, 161 або 181, тільки консервативними амінокислотними замінами.

55 55. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 52-54, де каркасні області у кожному мономері одного варіабельного домену містять один або декілька ключових залишків у положеннях амінокислот 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 та 108.

56. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 52-55, де FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:84; FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:105; FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:125; FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131; FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:79; FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:100; FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:120 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

60 57. Поліпептид за варіантом здійснення 56, модифікований таким чином, що FR1, FR2, FR3,



FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 мають амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80 % ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:83, 105, 125, 131, 79, 100 або 120.

58. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 51-57, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:59, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:59.

59. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 51-58, де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:217 або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:217, та де зазначений один варіабельний домен першого імуноглобуліну містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:216 або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:216.

60. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 3-14 або 22-39, де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:146, 166 та 186, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:146, 166 або 188, та де зазначений один варіабельний домен першого імуноглобуліну включає щонайменше одну CDR, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:151, 171 і 191, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:151, 171 або 191 (163E3/54B12).

61. Поліпептид за варіантом здійснення 60, що має структуру варіанту за варіантом здійснення 14, де у зазначеному одному варіабельному домені другого імуноглобуліну, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:146, CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:166; а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:186, та де у зазначеному одному варіабельному домені першого імуноглобуліну, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:151, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:171, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:191.

62. Поліпептид за варіантом здійснення 61, де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80 % ідентичні будь-якій з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:146, 166, 186, 151, 171 або 191.

63. Поліпептид за варіантом здійснення 61 або 62, де амінокислотні послідовності відрізняються від послідовностей SEQ ID NO:146, 166, 186, 151, 171 або 191, тільки консервативними амінокислотними замінами.

64. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 61-63, де каркасні області у кожному мономері одного варіабельного домену містять один або декілька ключових залишків у положеннях амінокислот 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 та 108, пронумерованих за Kabat.

65. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 61-64, де FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:84; FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:105; FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:125; FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131; FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:89; FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:110; FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:130 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

66. Поліпептид за варіантом здійснення 65, який модифікований таким чином, що FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 мають амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80 % ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:84, 105, 125, 131, 89, 110 або 130.

67. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 60-66, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:62, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:62.

68. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 60-64, де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:217, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:217, та де зазначений один варіабельний домен першого імуноглобуліну містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:219, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:219.

69. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 3-14 або 22-39, де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:145, 165 та 185, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:145, 165 або 185, та де зазначений один варіабельний домен

першого імуноглобуліну включає щонайменше одну CDR, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:151, 171 та 191, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:151, 171 або 191 (163D2/54B12).

70. Поліпептид за варіантом здійснення 69, що має структуру варіанту за варіантом здійснення 14, де у зазначеному одному варіабельному домені другого імуноглобуліну, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:145, CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:165, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:185, та де у зазначеному одному варіабельному домені першого імуноглобуліну, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:151, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:171, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:191.

71. Поліпептид за варіантом здійснення 70, де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80 % ідентичні будь-якій з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:145, 165, 185, 151, 171 або 191.

72. Поліпептид за варіантом здійснення 70 або 71, де амінокислотні послідовності відрізняються від послідовностей SEQ ID NO:145, 165, 185, 151, 171 або 191, тільки консервативними амінокислотними замінами.

73. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 70-72, де каркасні області у кожному мономері одного варіабельного домену містять один або декілька ключових залишків у положеннях амінокислот 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 та 108, пронумерованих за Kabat.

74. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 70-73, де FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:83; FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:104; FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:124; FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131; FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:89; FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:110; FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:130 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

75. Поліпептид за варіантом здійснення 74, який модифікований таким чином, що FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 мають амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80 % ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:83, 104, 124, 131, 89, 110 або 130.

76. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 69-75, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:63, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:63.

77. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 69-73, де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:218 або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:218, та де зазначений один варіабельний домен першого імуноглобуліну містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:219, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:219.

78. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 3-14 або 22-39, де зазначений один варіабельний домен першого імуноглобуліну включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:147, 167 та 187, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:147, 167 або 187, та де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну включає щонайменше одну CDR, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:146, 166 та 186, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:146, 166 або 186 (2B2/163E3).

79. Поліпептид за варіантом здійснення 78, що має структуру варіанту за варіантом здійснення 14, де у зазначеному одному варіабельному домені першого імуноглобуліну, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:147, CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:167, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:187, та де у зазначеному одному варіабельному домені другого імуноглобуліну, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:146, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:166, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:186.

80. Поліпептид за варіантом здійснення 79, де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80 % ідентичні кожний з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:147, 167, 187, 146, 166 або 186.

81. Поліпептид за варіантом здійснення 79 або 80, де амінокислотні послідовності відрізняються від послідовностей SEQ ID NO:147, 167, 187, 146, 166 або 186, тільки консервативними амінокислотними замінами.

82. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 79-81, де каркасні області у кожному

мономері одного варіабельного домену містять один або декілька ключових залишків у положеннях амінокислот 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 та 108, пронумерованих за Kabat.

83. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 79-82, де FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:85; FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:106; FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:126; FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131; FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:84; FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:105; FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:125 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

84. Поліпептид за варіантом здійснення 83, який модифікований таким чином, що FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 мають амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80 % ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:85, 106, 126, 131, 84, 105 або 125.

85. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 78-84, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:64, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:64.

86. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 78-82, де зазначений один варіабельний домен першого імуноглобуліну містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:213 або 214, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:213 або 214, та де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:217, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:217.

87. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 3-14 або 22-39, де зазначений один варіабельний домен першого імуноглобуліну включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:147, 167 та 187, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:147, 167 або 187, та де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну включає щонайменше одну CDR, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:145, 165 та 185, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:145, 165 або 185 (2B2/163D2).

88. Поліпептид за варіантом здійснення 87, що має структуру варіанту за варіантом здійснення 14, де у зазначеному одному варіабельному домені першого імуноглобуліну, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:147, CDR2 містить амінокислотну послідовність у SEQ ID NO:167, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:187, та де в зазначеному одному варіабельному домені другого імуноглобуліну, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:145, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:165, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:185.

89. Поліпептид за варіантом здійснення 88, де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80 % ідентичні будь-якій з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:147, 167, 187, 145, 165 або 185.

90. Поліпептид за варіантом здійснення 88 або 89, де амінокислотні послідовності відрізняються від послідовностей SEQ ID NO:147, 167, 187, 145, 165 або 185, тільки консервативними амінокислотними замінами.

91. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 88-90, де каркасні області у кожному мономері одного варіабельного домену містять один або кілька ключових залишків у положеннях амінокислот 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 та 108, пронумерованих за Kabat.

92. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 88-91, де FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:85; FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:106; FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:126; FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131; FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:83; FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:104; FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:124 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

93. Поліпептид за варіантом здійснення 94, який модифікований таким чином, що FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 мають амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80 % ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:85, 106, 126, 131, 83, 104 або 124.

94. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 87-93, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:65, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:65.

95. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 87-91, де зазначений один варіабельний домен першого імуноглобуліну містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:213 або 214, або

амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:213 або 214, та де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:218, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:218.

5 96. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 3-14 або 22-39, де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну включає щонайменше одну CDR, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:143, 163 та 183, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:143, 163 або 183, та де зазначений один варіабельний домен першого імуноглобуліну включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:147, 167 та 187, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:147, 167 або 187 (97A9/2B2).

10 97. Поліпептид за варіантом здійснення 96, що має структуру варіанту за варіантом здійснення 14, де у зазначеному одному варіабельному домені другого імуноглобуліну, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:143, CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:163, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:183, та де у зазначеному одному варіабельному домені першого імуноглобуліну, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:147, CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:167, а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:187.

20 98. Поліпептид за варіантом здійснення 97, де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80 % ідентичні будь-якій з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:143, 163, 183, 147, 167 або 187.

25 99. Поліпептид за варіантом здійснення 97 або 98, де амінокислотні послідовності відрізняються від послідовностей SEQ ID NO:143, 163, 183, 147, 167 або 187, тільки консервативними амінокислотними замінами.

100. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 97-99, де каркасні області у кожному мономері одного варіабельного домену містять один або кілька ключових залишків у положеннях амінокислот 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 та 108, пронумерованих за Kabat.

30 101. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 97-100, де FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:81; FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:102; FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:122; FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:133; FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:85; FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:106; FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:126 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

35 102. Поліпептид за варіантом здійснення 101, який модифікований таким чином, що FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 мають амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80 % ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:81, 102, 122, 133, 85, 106, 126 або 131.

40 103. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 96-102, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:47, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:47.

45 104. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 96-100, де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:215, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:215, та де зазначений один варіабельний домен першого імуноглобуліну містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:213 та 214, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:213 або 214.

50 105. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 3-14 або 22-39, де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну включає щонайменше одну CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO:143, 163 та 183, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:143, 163 або 183, та де зазначений один варіабельний домен першого імуноглобуліну включає щонайменше одну CDR, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:151, 171 та 191, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотним послідовностям SEQ ID NO:151, 171 або 191 (97A9/54B12).

60 106. Поліпептид за варіантом здійснення 105, що має структуру варіанту за варіантом здійснення 14, де у зазначеному одному варіабельному домені другого імуноглобуліну, CDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:143; CDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:163, а CDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:183, та де у

зазначеному одному варіабельному домені першого імуноглобуліну, CDR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:151; CDR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:171; а CDR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:191.

107. Поліпептид за варіантом здійснення 106, де амінокислотні послідовності CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 або CDR6 щонайменше на 80 % ідентичні будь-якій з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:143, 163, 183, 151, 171 або 191.

108. Поліпептид за варіантом здійснення 106 або 107, де амінокислотні послідовності відрізняються від послідовностей SEQ ID NO:143, 163, 183, 151, 171 або 191, тільки консервативними амінокислотними замінами.

109. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 106-108, де каркасні області у кожному мономері одного варіабельного домену містять один або декілька ключових залишків у положеннях амінокислот 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 та 108, пронумерованих за Kabat.

110. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 106-109, де FR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:81; FR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:102; FR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:122; FR4 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:133; FR5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:89; FR6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:110; FR7 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:130 та/або FR8 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:131.

111. Поліпептид за варіантом здійснення 110, який модифікований таким чином, що FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 та FR8 мають амінокислотні послідовності, які щонайменше на 80 % ідентичні амінокислотним послідовностям, представленим у будь-якій з SEQ ID NO:81, 102, 122, 133, 89, 110, 130 або 131.

112. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 105-111, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:61, або поліпептид, що має амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:61.

113. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 105-109, де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:215, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:215, та де зазначений один варіабельний домен першого імуноглобуліну містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:219, або амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:219.

114. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-113, що містить каркасні області з оптимізованою послідовністю, включаючи частково або повністю гуманізовані каркасні області.

115. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-114, який перехресно реагує з CXCR2 приматів, що не є людиною.

116. Поліпептид за варіантом здійснення 115, де зазначеним приматом є собакоподібна мавпа.

117. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-116, який не має здатність перехресно реагувати з CXCR2, що походять від видів, що не є приматами.

118. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-117, який не має здатність перехресно реагувати з іншими рецепторами хемокінів сімейства CXC.

119. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 та 114-118, де зазначений другий антигензв'язуючий домен розпізнає епітоп CXCR2, що містить амінокислотні послідовності, вибрані із групи, що складається з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:8, 9, 10, 11 та 12, або, що знаходиться у зазначених послідовностях.

120. Поліпептид за варіантом здійснення 119, де зазначений перший антигензв'язуючий домен розпізнає епітоп, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:7, або, що знаходиться у зазначеній послідовності.

121. Поліпептид за варіантом здійснення 119 або 120, де зазначений перший антигензв'язуючий домен розпізнає епітоп, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4, або, що знаходиться у зазначеній послідовності.

122. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 119-121, де зазначений другий антигензв'язуючий домен розпізнає епітоп, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO:5 або 6, або, що знаходиться у зазначених послідовностях.

123. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-122, який може специфічно зв'язуватися з CXCR2 людини з константою дисоціації ( $K_D$ ), що становить  $10^{-5}$  –  $10^{-12}$  моль/літр або менше, переважно,  $10^{-7}$  –  $10^{-12}$  моль/літр або менше, більш переважно,  $10^{-8}$  –  $10^{-12}$  моль/літр.

124. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-123, який може специфічно зв'язуватися з CXCR2 людини з константою швидкості асоціації  $k_{on}$ , що становить від  $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  та приблизно до  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; переважно, від  $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  до  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; більш переважно, від  $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  до  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; а саме, від  $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  до  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

5 125. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-124, який може специфічно зв'язуватися з CXCR2 людини з константою швидкості дисоціації  $k_{off}$ , що становить від  $1 \text{ s}^{-1}$  до  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , переважно, від  $10^{-2} \text{ s}^{-1}$  до  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , більш переважно, від  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  до  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , а саме,  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  до  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ .

10 126. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-125, який може специфічно зв'язуватися з CXCR2 людини з афінністю менше, ніж 500 нМ, переважно, менше, ніж 200 нМ, більш переважно, менше, ніж 10 нМ, наприклад, менше, ніж 500 нМ.

127. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-126, який може інгібувати зв'язування G $\alpha$ -з CXCR2 людини з IC50 менше, ніж 20 нМ.

15 128. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-127, який може інгібувати G $\alpha$ -індуковане вивільнення кальцію з еритроцитів (RBL), експресуючих CXCR2 людини IC50 менше, ніж 100 нМ.

129. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-128, який може інгібувати G $\alpha$ -індуковану акумуляцію [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S у CXCR2-вмісних мембранах CHO людини з IC50 менше, ніж 50 нМ.

20 130. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-129, де зазначений поліпептид присутній, в основному, у виділеній формі.

131. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-130, який являє собою мультипаратопну конструкцію.

25 132. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-131, який був модифікований таким чином, щоб він мав збільшений час напівжиття *in vivo* у порівнянні із часом напівжиття відповідної немодифікованої амінокислотної послідовності.

30 133. Поліпептид за варіантом здійснення 132, де зазначене збільшений час напівжиття надається однією або декількома зв'язуючими одиницями, вибраними із групи, що складається із сироваткових білків або їх фрагментів; зв'язуючих одиниць, які можуть зв'язуватися із сироватковими білками; Fc-частини та невеликих білків або пептидів, які можуть зв'язуватися із сироватковими білками.

134. Поліпептид за варіантом здійснення 133, де зазначені одна або декілька інших зв'язуючих одиниць, які надають поліпептиду збільшеного часу напівжиття, вибрані із групи, що складається з альбуміну сироватки людини або його фрагментів.

35 135. Поліпептид за варіантом здійснення 133, де зазначені одна або декілька інших зв'язуючих одиниць, які надають поліпептиду збільшеного часу напівжиття, вибрані із групи, що складається з зв'язуючих одиниць, які можуть зв'язуватися із сироватковим альбуміном (таким як альбумін сироватки людини) або із сироватковим імуноглобуліном (таким як IgG).

40 136. Поліпептид за варіантом здійснення 132, де зазначений збільшений час напівжиття надається однією або декількома іншими зв'язуючими одиницями, вибраними із групи, що складається з доменних антитіл, амінокислотних послідовностей, які можуть бути використані як доменне антитіло; однодоменних антитіл; "dAb", амінокислотних послідовностей, які можуть бути використані як dAb, або нанотіл, які можуть зв'язуватися із сироватковим альбуміном (таким як альбумін сироватки людини) або із сироватковим імуноглобуліном (таким як IgG).

45 137. Поліпептид за варіантом здійснення 134, де зазначеним поліпептидом є один варіабельний домен імуноглобуліну, який може зв'язуватися із сироватковим альбуміном (таким як альбумін сироватки людини) або із сироватковим імуноглобуліном (таким як IgG).

50 138. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 132-137, що має час напівжиття у сироватці, який щонайменше у 1,5 рази, переважно, щонайменше у 2 рази, а саме, щонайменше у 5 разів, наприклад, щонайменше у 10 разів або більше, ніж у 20 разів перевищує час напівжиття відповідного немодифікованого поліпептиду.

55 139. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 132-138, що має час напівжиття у сироватці, який більше, ніж на 1 годину, переважно, більше, ніж на 2 години, більш переважно, більше, ніж на 6 годин, а саме більше, ніж на 12 годин або навіть більше, ніж на 24, 48 або 72 години перевищує час напівжиття відповідного немодифікованого поліпептиду.

60 140. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 132-139, що має час напівжиття у сироватці людини, що становить щонайменше приблизно 12 годин, переважно, щонайменше 24 години, більш переважно, щонайменше 48 годин, ще більш переважно, щонайменше 72 години або більше, наприклад, щонайменше 5 днів (а саме, приблизно 5-10 днів), переважно,

щонайменше 9 днів (а саме, приблизно 9-14 днів), більш переважно, щонайменше приблизно 10 днів (а саме, приблизно 10-15 днів), або щонайменше приблизно 11 днів (а саме, приблизно 11-16 днів), більш переважно, щонайменше приблизно 12 днів (а саме, приблизно 12-18 днів або більше), або більше ніж 14 днів (а саме, приблизно 14-19 днів).

- 5 141. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-140, який є ПЕГільованим.
142. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-140, який є ПАСильованим.
143. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-140, який є ГЕКільованим.
144. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 36 або 37 або за будь-яким з варіантів здійснення 42-143, де зазначений додатковий антигензв'язуючий домен зв'язується із сироватковим білком з афінністю менше, ніж 500 нМ, переважно, менше, ніж 200 нМ, більш переважно, менше, ніж 10 нМ, наприклад, менше, ніж 500 нМ.
- 10 145. Молекула нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-144.
146. Молекула нуклеїнової кислоти, що кодує один варіабельний домен імуноглобуліну, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:25-43, 90 та 213-219.
- 15 147. Молекула нуклеїнової кислоти за варіантом здійснення 146, що містить нуклеотидну послідовність, вибрану із групи, що складається з послідовностей нуклеїнової кислоти SEQ ID NO:192-211.
- 20 148. Молекула нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з амінокислотних послідовностей SEQ ID NO:44-69.
149. Вектор експресії, що містить молекулу нуклеїнової кислоти як варіант за будь-яким з варіантів здійснення 145-148.
- 25 150. Клітина-хазяїн, здатна експресувати поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-149, що кодується послідовністю нуклеїнової кислоти за будь-яким з варіантів здійснення 145-148.
151. Одновалентне, двовалентне, мультивалентне, біпаратопне або мультипаратропне нанотіло, отримане шляхом культивування клітини-хазяїна за варіантом здійснення 150.
- 30 152. Фармацевтична композиція, що містить поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-144, та фармацевтично прийнятний носій або розріджувач.
153. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-144, використовуваний як лікарський засіб.
154. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-144, використовуваний для лікування хронічної обструктивної хвороби легенів (ХОХЛ) та ускладнень ХОХЛ.
- 35 155. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-144, використовуваний для лікування кистозного фіброзу, астми, астми у важкій формі, загострень астми, алергійної астми, гострого ураження легенів, гострого респіраторного дистрес-синдрому, ідіопатичного фіброзу легенів, ремоделювання дихальних шляхів, синдрому облітеруючого бронхіоліту або бронхопупльмонарної дисплазії.
- 40 156. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-144, використовуваний для лікування атеросклерозу, гломерулонефриту, запального захворювання кишечника (хвороби Крона), ангіогенезу та захворювань, що характеризуються утворенням нових кровоносних судин, включаючи дегенерацію жовтої плями, діабетичну ретинопатію та діабетичну невропатію, розсіяний склероз, псоріаз, вікову дегенерацію жовтої плями, очну хворобу Бехчета, увеїт, легеневу артеріальну гіпертензію (ЛАГ), включаючи ідіопатичну ЛАГ, спадкову ЛАГ та захворювання, пов'язане з ЛАГ; хронічні запальні захворювання, ревматоїдний артрит, остеоартрит, недрібноклітинну карциному, рак товстої кишки, рак підшлункової залози, рак стравоходу, рак яєчника, рак молочної залози, солідні пухлини та їх метастази, меланому, гепатоцелюлярну карциному або ішемічне реперфузійне ушкодження.
- 50 157. Спосіб лікування хронічної обструктивної хвороби легенів (ХОХЛ) або ускладнень ХОХЛ, де зазначений спосіб включає введення індивідууму ефективної кількості поліпептиду за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-144.
158. Спосіб лікування стану, вибраного із групи, що складається з кистозного фіброзу, астми, астми у важкій формі, загострень астми, алергійної астми, гострого ураження легенів, гострого респіраторного дистрес-синдрому, ідіопатичного фіброзу легенів, ремоделювання дихальних шляхів, синдрому облітеруючого бронхіоліту або бронхопупльмонарної дисплазії, де зазначений спосіб включає введення індивідууму ефективної кількості поліпептиду за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 41-143.
- 55 159. Спосіб лікування стану, вибраного із групи, що складається з атеросклерозу,
- 60

гломерулонефриту, запального захворювання кишечника (хвороби Крона), ангіогенезу та захворювань, що характеризуються утворенням нових кровоносних судин, включаючи дегенерацію жовтої плями, діабетичну ретинопатію та діабетичну невропатію, розсіяний склероз, псоріаз, вікову дегенерацію жовтої плями, очну хворобу Бехчета, увеїт, легеневу артеріальну гіпертензію (ЛАГ), включаючи ідіопатичну ЛАГ, спадкову ЛАГ та захворювання, пов'язане з ЛАГ; хронічні запальні захворювання, ревматоїдний артрит, остеоартрит, недрібноклітинну карциному, рак товстої кишки, рак підшлункової залози, рак стравоходу, рак яєчника, рак молочної залози, солідні пухлини та їх метастази, меланому, гепатоцелюлярну карциному та ішемічне реперфузійне ушкодження, де зазначений спосіб включає введення індивідууму ефективної кількості поліпептиду за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-144.

160. Застосування поліпептиду за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-144 для одержання лікарського препарату для лікування хронічної обструктивної хвороби легенів (ХОХЛ) або ускладнень ХОХЛ.

161. Застосування поліпептиду за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-144 для одержання лікарського препарату для лікування астми, астми у важкій формі, загострень астми, алергійної астми, гострого ураження легенів, гострого респіраторного дистрес-синдрому, ідіопатичного фіброзу легенів, ремоделювання дихальних шляхів, синдрому облітеруючого бронхіоліту або бронхопальмонарної дисплазії.

162. Застосування поліпептиду за будь-яким з варіантів здійснення 1-38 або 42-144 для одержання лікарського препарату для лікування атеросклерозу, гломерулонефриту, запального захворювання кишечника (хвороби Крона), ангіогенезу та захворювань, що характеризуються утворенням нових кровоносних судин, включаючи дегенерацію жовтої плями, діабетичну ретинопатію та діабетичну невропатію, розсіяний склероз, псоріаз, вікову дегенерацію жовтої плями, очну хворобу Бехчета, увеїт, легенеvu артеріальну гіпертензію (ЛАГ), включаючи ідіопатичну ЛАГ, спадкову ЛАГ та захворювання, пов'язане з ЛАГ; хронічні запальні захворювання, ревматоїдний артрит, остеоартрит, недрібноклітинну карциному, рак товстої кишки, рак підшлункової залози, рак стравоходу, рак яєчника, рак молочної залози, солідні пухлини та їх метастази, меланому, гепатоцелюлярну карциному або ішемічне реперфузійне ушкодження.

163. Поліпептид за будь-яким з варіантів здійснення 1-38, який має здатність перехресно блокувати зв'язування CXCR2 з поліпептидом за будь-яким з варіантів здійснення 49, 58, 67, 76, 85, 94, 103 або 112.

164. Молекула за будь-яким з варіантів здійснення 39-41, де зазначені перший та другий антигензв'язуючі домени мають будь-яку з відмітних ознак, характерних для зазначених доменів за будь-яким з варіантів здійснення 1-22, 32-38 або 42-144.

165. Молекула за варіантом здійснення 164, що має будь-яку з відмітних ознак за варіантами здійснення 106-135.

166. Поліпептид, що містить щонайменше один варіабельний домен одного імунoglobуліну, який спрямований безпосередньо проти CXCR2 або зв'язується з CXCR2, та який має здатність перехресно блокувати зв'язування CXCR2 з поліпептидом за будь-яким з варіантів здійснення 49, 58, 67, 76, 85, 94, 103 або 112.

167. Поліпептид за варіантами здійснення 3-14 та 22-39, що має таку ж структуру, що і варіант за варіантом здійснення 14, де зазначений один варіабельний домен другого імунoglobуліну містить амінокислотні послідовності CDR, пронумеровані відповідно до Kabat, та кодуємі депонованою плазмідною DSM 23727, та де зазначений один варіабельний домен першого імунoglobуліну містить амінокислотні послідовності CDR, пронумеровані відповідно до Kabat та кодуємі депонованою плазмідною DSM 23726.

168. Поліпептид за варіантом здійснення 167, який, у зазначеному одному варіабельному домені другого імунoglobуліну, також містить області FR з амінокислотними послідовностями, які пронумеровані відповідно до Kabat та кодуються депонованою плазмідною DSM 23727, та який, у зазначеному одному варіабельному домені першого імунoglobуліну, містить області FR з амінокислотними послідовностями, які пронумеровані відповідно до Kabat та кодуються депонованою плазмідною DSM 23726.

169. Поліпептид за варіантом здійснення 168, де зазначений один варіабельний домен другого імунoglobуліну пов'язаний із зазначеним одним варіабельним доменом першого імунoglobуліну за допомогою пептидного лінкеру з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:220.

170. Поліпептид за варіантами здійснення 3-14 та 22-39, що має таку ж структуру, що і варіант за варіантом здійснення 14, де зазначений один варіабельний домен другого





імуноглобуліну за допомогою пептидного лінкеру з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:220.

182. Поліпептид за варіантами здійснення 3-14 та 22-39, що має таку ж структуру, що і варіант за варіантом здійснення 14, де зазначений один варіабельний домен першого імуноглобуліну містить амінокислотні послідовності CDR, які пронумеровані відповідно до Kabat та кодуються депонованою плазмідною DSM 23723, та де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну містить амінокислотні послідовності CDR, які пронумеровані відповідно до Kabat та кодуються депонованою плазмідною DSM 23727.

183. Поліпептид за варіантом здійснення 182, який, у зазначеному одному варіабельному домені першого імуноглобуліну, також містить області FR з амінокислотними послідовностями, які пронумеровані відповідно до Kabat та кодуються депонованою плазмідною DSM 23723, та який, у зазначеному одному варіабельному домені другого імуноглобуліну, містить області FR з амінокислотними послідовностями, які пронумеровані відповідно до Kabat та кодуються депонованою плазмідною DSM 23727.

184. Поліпептид за варіантом здійснення 183, де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну пов'язаний із зазначеним одним варіабельним доменом першого імуноглобуліну за допомогою пептидного лінкеру з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:220.

185. Поліпептид за варіантами здійснення 3-14 та 22-39, що має таку ж структуру, що і варіант за варіантом здійснення 14, де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну містить амінокислотні послідовності CDR, які пронумеровані відповідно до Kabat та кодуються депонованою плазмідною DSM 23724, та де зазначений один варіабельний домен першого імуноглобуліну містить амінокислотні послідовності CDR, які пронумеровані відповідно до Kabat та кодуються депонованою плазмідною DSM 23723.

186. Поліпептид за варіантом здійснення 185, який, у одному варіабельному домені другого імуноглобуліну, також містить області FR з амінокислотними послідовностями, які пронумеровані відповідно до Kabat та кодуються депонованою плазмідною DSM 23724, та який, у зазначеному одному варіабельному домені першого імуноглобуліну, містить області FR з амінокислотними послідовностями, які пронумеровані відповідно до Kabat та кодуються депонованою плазмідною DSM 23723.

187. Поліпептид за варіантом здійснення 186, де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну пов'язаний із зазначеним одним варіабельним доменом першого імуноглобуліну за допомогою пептидного лінкеру з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:220.

188. Поліпептид за варіантами здійснення 3-14 та 22-39, що має таку ж структуру, що і варіант за варіантом здійснення 14, де зазначений один варіабельний домен другого імуноглобуліну містить амінокислотні послідовності CDR, які пронумеровані відповідно до Kabat та кодуються депонованою плазмідною DSM 23724, та де зазначений один варіабельний домен першого імуноглобуліну містить амінокислотні послідовності CDR, які пронумеровані відповідно до Kabat та кодуються депонованою плазмідною DSM 23728.

189. Поліпептид за варіантом здійснення 188, який у одному варіабельному домені другого імуноглобуліну, також містить області FR з амінокислотними послідовностями, які пронумеровані відповідно до Kabat та кодуються депонованою плазмідною DSM 23724, та який, у зазначеному одному варіабельному домені першого імуноглобуліну, містить області FR з амінокислотними послідовностями, які пронумеровані відповідно до Kabat та кодуються депонованою плазмідною DSM 23728.

190. Поліпептид за варіантом здійснення 189, де один варіабельний домен другого імуноглобуліну пов'язаний із зазначеним одним варіабельним доменом першого імуноглобуліну за допомогою пептидного лінкеру з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:220.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Поліпептид, який містить щонайменше два антигензв'язуючих домени імуноглобуліну, де поліпептид спрямований проти хемокінового рецептора CXCR2 або зв'язується з цим рецептором, причому поліпептид включає перший антигензв'язуючий домен, який міститься у першому імуноглобуліновому окремому варіабельному домені, розпізнає перший епітоп на CXCR2 та здатний зв'язуватися з лінійним пептидом, що складається з амінокислотної послідовності відповідно до SEQ ID NO:7, і другий антигензв'язуючий домен, який міститься у другому імуноглобуліновому окремому варіабельному домені антитіла, розпізнає другий епітоп на CXCR2 та не здатний зв'язуватися із зазначеним лінійним пептидом, або зв'язується із

зазначеним лінійним пептидом з меншою афінністю, причому зазначений другий антигензв'язуючий домен включає CDR1, що містить амінокислотну послідовність відповідно до SEQ ID NO:141, CDR2, що містить амінокислотну послідовність відповідно до SEQ ID NO:236, і CDR3, що містить амінокислотну послідовність відповідно до SEQ ID NO:181, і

5 де зазначений перший антигензв'язуючий домен включає CDR4, що містить амінокислотну послідовність відповідно до SEQ ID NO:146, CDR5, що містить амінокислотну послідовність відповідно до SEQ ID NO:237, і CDR6, що містить амінокислотну послідовність відповідно до SEQ ID NO:186.

10 2. Поліпептид за п. 1, де щонайменше один з першого та другого антигензв'язуючих доменів міститься в  $V_{HH}$ -доміні або в його фрагменті, що походить від одного важкого ланцюга антитіла з важким ланцюгом, отриманого від тварини сімейства верблюжих, або є його варіантом з оптимізованою послідовністю.

3. Поліпептид за п. 2, де кожний з антигензв'язуючих доменів міститься в  $V_{HH}$ -доміні або в його фрагменті, що походить від одного важкого ланцюга антитіла з важким ланцюгом, отриманого від тварини сімейства верблюжих, або є його варіантом з оптимізованою послідовністю.

15 4. Поліпептид за будь-яким з попередніх пунктів, у якому щонайменше два антигензв'язуючих домени зв'язані за допомогою лінкера.

5. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-4, який має наступну структуру:

20 i) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--ЛІНКЕР--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8-ЛІНКЕР-HLE,

причому, якщо FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 містить перший антигензв'язуючий домен, то FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 містить другий антигензв'язуючий домен, та якщо FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 містить другий антигензв'язуючий домен, то FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 містить перший антигензв'язуючий домен, а HLE являє собою зв'язуючу

25 одиницю, що сприяє збільшенню часу напівжиття *in vivo*.

6. Поліпептид за п. 1, у якому перший антигензв'язуючий домен вибраний з SEQ ID NO:216, а

другий антигензв'язуючий домен вибраний з SEQ ID NO:217.

7. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-5, що містить SEQ ID NO:221.

30 8. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-5, що містить каркасні області з оптимізованою послідовністю.

9. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-5, у якому перший антигензв'язуючий домен зв'язується з епітопом, що містить амінокислоти F11, F14 і W15 послідовності SEQ ID NO:1

10. Поліпептид за п. 9, у якому епітоп є лінійним.

35 11. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-5, у якому другий антигензв'язуючий домен зв'язується з епітопом у зовнішніх петлях CXCR2 людини (амінокислотні залишки 106-120, 184-208 і 274-294 послідовності SEQ ID NO:1).

12. Поліпептид за п. 11, де епітоп знаходиться в межах амінокислотних залишків 106-120 послідовності SEQ ID NO:1.

13. Поліпептид за п. 11, де епітоп є конформаційним.

40 14. Поліпептид за п. 13, у якому другий антигензв'язуючий домен зв'язується з епітопом CXCR2, що містить амінокислотні залишки W112, G115, I282 і T285 послідовності SEQ ID NO:1.

15. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-5, який модифікований так, що він має збільшений час напівжиття *in vivo*, у порівнянні із часом напівжиття відповідної немодифікованої амінокислотної послідовності.

45 16. Поліпептид за п. 15, у якому збільшений час напівжиття забезпечений однією або декількома зв'язуючими одиницями, вибраними з групи, що складається з сироваткових білків або їх фрагментів, зв'язуючих одиниць, які можуть зв'язуватися з сироватковими білками, Fc-частини, та невеликих білків або пептидів, які можуть зв'язуватися з сироватковими білками.

50 17. Поліпептид за п. 16, у якому додатковий антигензв'язуючий домен містить SEQ ID NO:228 (Alb8).

18. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-5, що складається з послідовності, вибраної з послідовностей SEQ ID NO:225.

19. Молекула нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид за будь-яким з пп. 1-18.

20. Вектор експресії, що містить молекулу нуклеїнової кислоти за п. 19.

55 21. Клітина-хазяїн, здатна експресувати поліпептид за будь-яким з пп. 1-16 з послідовністю нуклеїнової кислоти за п. 19.

22. Біпаратопне або мультипаратопне Нанотіло, отримане шляхом культивування клітини-хазяїна за п. 21.

60 23. Фармацевтична композиція, що містить поліпептид за будь-яким з пп. 1-18, і фармацевтично прийнятний носій або розріджувач.

24. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-18, для використання як лікарський засіб.

25. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-18, для використання у лікуванні хронічної обструктивної хвороби легенів (ХОХЛ) і ускладнень ХОХЛ.

5 26. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-18, для використання у лікуванні кістозного фіброзу, астми, астми у важкій формі, загострень астми, алергійної астми, гострого ураження легенів, гострого респіраторного дистрес-синдрому, ідіопатичного фіброзу легенів, ремоделювання дихальних шляхів, синдрому облітеруючого бронхіоліту або бронхопультмонарної дисплазії.

10 27. Поліпептид за будь-яким з пп. 1-18, для використання у лікуванні атеросклерозу, гломерулонефриту, запального захворювання кишечника (хвороби Крона), ангіогенезу, дегенерації жовтої плями, діабетичної ретинопатії й діабетичної невропатії, розсіяного склерозу, псоріазу, вікової дегенерації жовтої плями, очної хвороби Бехчета, увеїту, легеневої артеріальної гіпертензії (ЛАГ), ідіопатичної ЛАГ, спадкової ЛАГ і асоційованої ЛАГ, хронічних запальних захворювань, ревматоїдного артрити, остеоартрити, недрібноклітинної карциноми, раку товстої кишки, раку підшлункової залози, раку стравоходу, раку яєчника, раку молочної залози, солідних пухлин і їх метастазів, меланоми, гепатоцелюлярної карциноми, ішемічного реперфузійного ушкодження, закупорки судин, викликані гемолітичною трансфузією при серповидно-клітинній анемії, ішемічного/реперфузійного ушкодження, гострого інсульту/інфаркту міокарда, закритої травми голови, посттравматичного запалення або інсулінорезистентного діабету.

20

---

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601