



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104487456 B

(45)授权公告日 2018.04.13

(21)申请号 201380036290.9

(22)申请日 2013.05.08

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104487456 A

(43)申请公布日 2015.04.01

(30)优先权数据

61/644,582 2012.05.09 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.01.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2013/053711 2013.05.08

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/168108 EN 2013.11.14

(73)专利权人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 Z·布朗 M·布拉德利

S·J·查尔顿 G·A·范黑克

K·克罗米 B·东布雷克特

S·斯特芬森 J·鲍迈斯德

M-P·布歇 C·布东 M-A·比斯

V·斯诺埃克 S·斯塔埃朗

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

(56)对比文件

CN 103328512 A, 2013.09.25,

US 5440021 A, 1995.08.08,

US 2003186889 A1, 2003.10.02,

WO 2010043650 A2, 2010.04.22,

CN 101070346 A, 2007.11.14,

审查员 段珊

权利要求书2页 说明书86页

序列表97页 附图5页

(54)发明名称

CXCR2的双互补位结合多肽及其用途

(57)摘要

本发明涉及针对或特异性结合趋化因子受体CXCR2的多肽,特别是能够调节CXCR2的信号转导的多肽。本发明还涉及能够表达本发明的多肽的核酸、载体和宿主细胞,包含多肽的药物组合物,和所述多肽和组合物用于治疗涉及CXCR2功能异常的疾病的用途。

1. 多肽,其包含下述结构之一:

●FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4—接头--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8-EXT

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

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

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

其中如果FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4包含第一抗原结合结构域,则FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8包含第二抗原结构域,并且如果FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4包含第二抗原结构域,则FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8包含第一抗原结合结构域:HLE是提供增加的体内半寿期的结合单元并且EXT是由两个丙氨酸残基(AA)组成的C末端延伸,

其中所述多肽包含由SEQ ID No 141所示氨基酸序列组成的CDR1,由SEQ ID No 236所示氨基酸序列组成的CDR2,由SEQ ID No 181所示氨基酸序列组成的CDR3,由SEQ ID No 146所示氨基酸序列组成的CDR4,由SEQ ID No 237所示氨基酸序列组成的CDR5,并且由SEQ ID No 186所示氨基酸序列组成的CDR6。

2. 权利要求1的多肽,其中第一抗原结合结构域选自SEQ ID No.216,并且第二抗原结合结构域选自SEQ ID No.217。

3. 多肽,其包含SEQ ID No.221和由2个丙氨酸残基组成的C末端延伸。

4. 多肽,其包含SEQ ID No.225的序列和由两个丙氨酸残基组成的C末端延伸。

5. 编码根据权利要求1至4中任一项的多肽的核酸分子。

6. 药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1至4中任一项的多肽和可药用的载剂或稀释剂。

7. 根据权利要求1至4中任一项的多肽,所述多肽用作药物。

8. 权利要求1至4中任一项的多肽,所述多肽用于治疗慢性阻塞性肺病(COPD)和COPD的恶化。

9. 权利要求1至4中任一项的多肽,所述多肽用于治疗囊性纤维化、哮喘、急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征、特发性肺纤维化、气道重塑、细支气管炎闭塞综合征或支气管肺发育异常。

10. 权利要求1至4中任一项的多肽,所述多肽用于治疗动脉粥样硬化、肾小球性肾炎、炎症肠病、克氏病、血管发生、黄斑退化、糖尿病视网膜病、糖尿病肾病、多发性硬化、银屑病、坏疽性脓皮病、眼部白塞病、葡萄膜炎、肺动脉高压(PAH)、慢性炎症性疾病、骨关节炎、非小细胞癌、结肠癌、胰腺癌、食道癌、卵巢癌、乳腺癌、黑素瘤、肝细胞癌、镰刀细胞疾病中由溶血性输血诱导的血管闭塞危险、再灌注损伤、急性中风/心肌梗塞、闭锁性头部损伤、创伤后炎症或胰岛素抗性糖尿病。

11. 权利要求9的多肽,用于治疗严重哮喘和哮喘恶化。

12. 权利要求10的多肽,用于治疗衰老相关的黄斑退行性疾病。

13. 权利要求10的多肽,用于治疗类风湿性关节炎。

CXCR2的双互补位结合多肽及其用途

[0001] 本发明涉及针对或特异性结合趋化因子受体CXCR2的多肽,特别地涉及能够调节来自CXCR2的信号转导的多肽。本发明还涉及能够表达本发明的多肽的核酸、载体和宿主细胞,包含多肽的药物组合物,和所述多肽和组合物用于治疗慢性阻塞性肺病(COPD)和涉及CXCR2功能异常的其他疾病的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 慢性阻塞性肺病(COPD)是用于描述一系列特征是气流受限的病症的术语,其在大部分情况下是进行性的,并与肺对有毒颗粒的异常炎性应答相关,与导致呼吸道功能降低的肺实质破坏相关(Barnes PJ等人,2003,Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms.Eur.Respir J,22,672-688;Barnes PJ等人,2004,Mediators of Chronic obstructive pulmonary disease.Pharmacol.Rev.56,515-548)。虽然遗传因素和环境因素促进COPD的发展,但吸烟是最重要的单一原因,伴随有导致肺功能进行性下降的复发性肺部感染。只有当较早实施时,戒烟才降低疾病的发展,而在出现显著症状后则几乎没有效果。一些共患病况与COPD相关,如哮喘、心血管疾病、抑郁和肌肉萎缩(Mannino DM和Buist S,2007 Global burden of COPD:risk factors,prevalence and future trends.Lancet,370,765-773)。

[0004] 趋化因子是趋化性因子中占优势的,因此在协律COPD肺中的慢性炎症及其在急性恶化的过程中的进一步扩大中具有关键性作用。趋化因子IL-8(CXCL8)、GRO α (CXCL1)和ENA-78(CXCL5)的生物学活性是由两群细胞表面受体CXCR1和CXCR2介导的,所述受体存在于白细胞和全身许多其他细胞类型上。白细胞的迁移主要是通过CXCR2介导的,CXCR2结合若干种配体,包括IL-8、GRO α 、 β 、 γ 、ENA78和GCP-2。相反,CXCR1被IL-8选择性的激活,并被GCP-2较低程度激活。仍然不清楚人嗜中性粒细胞的体内趋化作用是由一种还是两种受体介导的。

[0005] CXCR2在氨基酸水平与CXCR1共享78%同源性,并且两种受体以不同的分布模式存在于嗜中性粒细胞。CXCR在多种细胞和组织上(包括CD8+T细胞、NK、单核细胞、肥大细胞、表皮、内皮、平滑肌和一大类中枢神经系统的细胞类型)的表达提示了该受体在组成型条件和多种急性和慢性疾病的病理生理学中具有广泛的功能作用。CXCR2活化刺激受体与鸟嘌呤核苷酸结合蛋白的Gi家族,这反过来刺激细胞内磷酸肌醇的释放,增加的胞内Ca²⁺,和,通过ERK1/2-依赖性的机制,与受指导的细胞向趋化因子梯度迁移相关的胞内蛋白质的磷酸化。一经活化,CXCR2就被磷酸化,并通过抑制蛋白/发动蛋白-依赖性的机制快速内化,导致受体脱敏。此过程与对于大部分其他GPCR所观察到的结果相似,但激动剂诱导的CXCR2内化的速率和程度大于对于CXCR1所见到的(Richardson RM,Pridgen BC,Haribabu B,Ali H,Synderman R.1998Differential cross-regulation of the human chemokine receptors CXCR1and CXCR2.Evidence for time-dependent signal generation.J Biol.Chem,273,23830-23836)。

[0006] IL-8已长期被暗示为COPD中嗜中性粒细胞炎症的介质(Keatings VM等人,1996,Differences in IL-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from

patients with COPD and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153, 530–534; Yamamoto C 等人, 1997 Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest*, 112, 505–510)。在COPD患者的支气管呼吸道、小呼吸道和肺实质的活组织切片中, 存在T细胞渗入和增加的嗜中性粒细胞数, 特别是在呼吸道腔中 (Hogg JC 等人, 2004, The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Eng. J. Med.* 350, 2645–2653)。嗜中性粒细胞在COPD患者的肺中增加, 并且这与疾病的严重程度相关 (Keatings VM 等人, 1996, Differences in IL-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with COPD and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153, 530–534)。此外, TNF α 的水平在COPD患者的痰中升高, 并且这从呼吸道的表皮细胞中诱导IL-8 (Keatings)。相比正常的吸烟者和不吸烟者, COPD患者的诱导的痰和支气管肺泡灌洗 (BAL) 液中的GRO α 浓度明显上升 (Traves SL 等人, 2002, Increased levels of the chemokines GRO α and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax*, 57, 50–595; Pesci A. 等人 1998, Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with COPD. *Eur Respir J.* 12, 380–386)。GRO α 是由肺泡巨噬细胞和呼吸道表皮细胞响应TNF α 刺激的分泌的并选择性地激活CXCR2, 对于嗜中性粒细胞和单核细胞是趋化性的。在COPD患者中, 单核细胞对GRO α 的趋化性应答增加, 可能与这些细胞中增加的CXCR2更新或再生相关 (Traves SL 等人, 2004, Specific CXC but not CC chemokines cause elevated monocyte migration in COPD: a role for CXCR2, *J Leukoc. Biol.* 76, 441–450)。病毒和细菌性肺部感染经常导致COPD患者的严重恶化, 其特征是呼吸道中增加的嗜中性粒细胞数 (Wedzicha JA, Seemungal TA., 2007, COPD exacerbations: defining their cause and prevention, *Lancet* 370 (9589): 786–96)。患急性严重的COPD恶化的患者的支气管活组织切片具有显著增加的ENA-78、IL-8和CXCR2 mRNA的表达量 (Qiu Y 等人, 2003, 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), 且痰具有增加的嗜中性粒细胞计数 (Bathoorn E, Liesker JJW, Postma DS 等人, Change in inflammation in out-patient COPD patients from stable phase to a subsequent exacerbation, (2009) *Int J COPD*, 4 (1): 101–9), 提示该受体在COPD和该疾病的严重恶化中都具有潜在的作用。增加的CXCR2 mRNA表达存在于支气管活组织切片标本中, 与组织嗜中性粒细胞的存在相关 (Qiu 2003)。ENA-78主要源自上皮细胞, 在COPD恶化的过程中, ENA-78在上皮细胞中的表达明显增加 (Qiu 2003)。因为IL-8、GRO α 和ENA-78的浓度在COPD呼吸道中增加, 并且这三种配体都通过CXCR2发信号, 因此, 用选择性的拮抗剂阻断该共同受体将是该疾病中有效的抗炎对策。

[0007] COPD缓慢且进行性的发展, 传统上用肺功能测试 (如测量用力呼气量 (FEV₁) 的肺量测定法) 评估疾病发展。具有<50%的预测的FEV₁的患者被分类为严重。肺功能与死亡率密切相关, 约35%的严重COPD患者在12年内死于该疾病, 相比仅5%的轻至中度患者在12年内死于该疾病。COPD是世界第四位的死亡原因 (世界卫生组织 (WHO), World Health Report, Geneva, 2000. 可从URL: http://www.who.int/whr/2000/en/whr00_annex_en.pdf 获得), 并且可以预测其流行程度和死亡率在未来数十年间仍将增加 (Lopez AD, Shibuya

K,Rao C等人,2006,Chronic obstructive pulmonary disease:current burden and future projections,Eur Respir J,27 (2) ,397-412)。恶化是不健康的螺旋式下降的关键因素,是造成大部分COPD入院病例的原因(BTS(British Thoracic Society) ,2006,Burden of Lung Disease Report,第2版,http://www.brit-thoracic.org.uk/Portals/0/Library/BTS%20Publications/burden_of_lung_disease2007.pdf)。症状定义型恶化的平均年速率是2.3,医疗定义型恶化的平均年速率是2.8(O'Reilly JF,Williams AE,Holt K等人,2006,Prim Care Respir J.15 (6) :346-53)。早期诊断、改善的对患者的恶化管理,以及改善的预防可帮助降低这些入院者对现有稀缺的医疗资源造成的压力。可利用的COPD治疗主要是姑息性的,没有可利用的阻止肺功能衰减或与疾病相关的呼吸道进行性破坏的疗法。现有疗法使用例如短效和长效 β -肾上腺素能支气管扩张药、吸入式抗胆碱能药物(毒蕈碱型拮抗剂)和吸入式皮质类固醇治疗疾病的症状和恶化。现有的皮质类固醇疗法的主要限制是随着患者出现对皮质类固醇的抗性使得它们无效,使这些药物的抗炎作用失活。很明显,对于阻止COPD发展的新型药物仍然存在巨大的未满足的医学诉求。趋化因子受体拮抗剂是令人感兴趣的COPD疗法的方法,因为COPD中的炎性细胞信号运输受多种趋化因子协律,因此用LMW拮抗剂阻断趋化因子受体可能是该疾病有效的抗炎对策。COPD的关键特征是在正常吸烟者中可见的炎性应答扩大,因此,疗法的目标不是完全抑制炎性细胞渗入,而是将渗入水平降低至没有COPD的正常吸烟者中可见的水平。通过特异性作用,抗CXCR2将避免与类固醇相关的一般性免疫抑制-CXCR1活性的保留允许基线嗜中性粒细胞活化,这对于COPD和CF中的宿主防御是重要的。目前,大部分的COPD药物是通过吸入施用的,以降低全身性的副作用,然而,由于趋化因子拮抗剂作用于在循环的炎性细胞中表达的受体上,因此全身性施用将是最佳的。它将提供到达在COPD中受影响的小呼吸道和肺实质的有效途径。

[0008] 趋化因子受体与细胞因子和白介素受体相反,属于高度“可施药的”7TM-GPCR超家族。除此以外,为了发现强力拮抗剂的早期尝试面临了比基于具有小肽或生物能胺配体的GPCR经验所预期的更多的困难。对于关注趋化因子-受体拮抗剂的小分子药物发现程序做出的工作开始逐渐了解到趋化因子受体的特异性,和小分子作为拮抗剂发挥作用所需的结构元件。有趣的是,如所鉴别的根本不同的化学系列物的数目所表示的,CC-趋化因子-受体拮抗剂的结构多样性明显高于CXC-趋化因子-受体拮抗剂,提示发现拮抗剂的相对难度在两类受体之间可能是不同的。

[0009] 一般而言,已证实趋化因子受体是难以拮抗的靶,并且为了鉴别有力的、选择性的CXCR2拮抗剂已付出了巨大的努力。在1998年描述了第1个低分子量的CXCR2拮抗剂,从那以后,已研发了多个非竞争性的变构CXCR2拮抗剂,其中一些目前已进入临床试验。然而仍然明确需要更好和更有力的CXCR2功能的拮抗剂。

[0010] 在过去约10年间,免疫球蛋白类分子的临床用途发生了巨大的扩展。它们对靶的特异性和使用重组技术改造它们的能力为研发疾病的高针对性的治疗提供了巨大的潜力。许多类型的免疫球蛋白分子和修饰的免疫球蛋白分子都潜在地可用于合适的改造,包括常规的四链抗体、Fab和F(ab)₂片段、单结构域抗体(D(ab)s)、单链Fvs和纳米抗体。本文中 will 结合本发明对这些进行进一步讨论,本发明涉及被构建为针对CXCR2的至少两个表位的多肽。

[0011] 因此,本发明的目标是提供了用于预防或治疗慢性阻塞性肺病症或COPD和与趋化因子受体CXCR2的功能异常相关的其他疾病的新手段。

[0012] 本发明的其他目标是提供治疗或预防COPD和与CXCR2的功能异常相关的其他疾病的手段,所述手段是免疫疗法。

[0013] 本发明的另一目标是提供包含免疫球蛋白CDR的多肽,所述多肽是CXCR2信号转导的拮抗剂。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明涉及包含2个免疫球蛋白抗原结合结构域的多肽,所述多肽针对或结合趋化因子受体CXCR2,其中所述第一抗原结合结构域包含在来自源自骆驼科动物的重链抗体的单条重链的第一V_H结构域或其片段中,或是其序列优化的,包括人源化的变体,并且所述第二抗原结合结构域包含在来自源自骆驼科动物的重链抗体的单条重链的第二V_H结构域或其片段中,或是其序列优化的,包括人源化的变体并且其中多肽的C末端包含至少一个额外的氨基酸残基的向抗原结合结构域的序列的延伸,并且其中第一抗原结合结构域识别CXCR2上的第一表位并且第二抗原结合结构域识别CXCR2上的第二表位。本发明的优选的多肽包含能够结合由SEQ ID No.7中所示氨基酸序列组成的线性肽的第一抗原结合结构域,和不能结合或者以低亲和力结合所述线性肽的第二抗原结合结构域。SEQ ID NO.7是人CXCR2的前19个N末端氨基酸。本发明的优选的多肽是双互补位的。如本文中使用的,术语“双互补位”意指多肽包含识别同一蛋白质靶上的两个不同表位的两个抗原结合结构域。然而,多互补位即,含有识别同一蛋白质靶上的3、4或更多个表位的抗原结合结构域的多肽,以及是双-或多互补位且多价即,也具有识别一个或多个其他靶蛋白的抗原结合结构域的多肽,也涵盖在本发明的范围内。

[0016] 在本发明的优选的多肽中,包含第一抗原结合结构域的氨基酸序列和包含第二抗原结合结构域的氨基酸序列通过接头区连接。如本文中更详细的讨论所述,接头可以是或不是免疫球蛋白来源的,但优选是肽。

[0017] 在本文中,具有可自骆驼科动物获得的仅有重链的抗体类型的V_H氨基酸序列或其片段或变体的免疫球蛋白单可变结构域可备选地称为“V_H结构域”或其片段,或被称为“纳米抗体(Nanobody)”。必须注意到,**Nanobody®**、**Nanobodies®**和**Nanoclone®**是Ablynx N.V.的注册商标。

[0018] 在本发明的多肽中,每个抗原结合结构域包含至少一个本文定义的CDR,优选2个或3个CDR。在本发明的优选的多肽中,免疫球蛋白单可变结构域的优选的结构是具有:

[0019] FR-CDR-FR-CDR-FR-CDR-FR

[0020] 结构的V_H结构域或纳米抗体的结构,其中本文中另外定义了CDR和FR。

[0021] 根据本发明的优选的双互补位纳米抗体具有下列结构之一:

[0022] • FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--接头--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8-EXT

[0023] • FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4—接头--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8—接头—HLE-EXT

[0024] • FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--接头--HLE—接头--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8-EXT

[0025] • HLE—接头—FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4—接头—FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8-EXT

[0026] 其中如果FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4包含第一抗原结合结构域,则FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8包含第二抗原结构域,而如果FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4包含第二抗原结构域,则FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8包含第一抗原结合结构域:HLE是提供增加的体内半寿期的结合单元并且EXT是至少一个额外的氨基酸残基的C末端延伸。

[0027] 本发明涵盖了上述优选的双互补位纳米抗体的片段或变体,包括其中CDR和FR是骆驼科动物来源的实施方案,或其中一个或多个FR具有至少一个人源化替换并且优选被完全人源化的实施方案。

[0028] 根据本发明的特别优选的双互补位纳米抗体是本文中命名为163D2/127D1、163E3/127D1、163E3/54B12、163D2/54B12、2B2/163E3、2B2/163D2、97A9/2B2和97A9/54B12的抗体,其还具有包含至少一个额外的氨基酸残基的C末端延伸,其氨基酸序列显示在表13中,并且特别是其变体,其中FR包括本文定义的序列优化的氨基酸替换,如在表32中显示了组分的纳米抗体。

[0029] 根据本发明的其他特别优选的双互补位纳米抗体是表33中所示的那些,其还具有包含至少一个额外的氨基酸残基的C末端延伸。

[0030] 本发明的优选的多肽结合包含SEQ ID No.1 (CXCR2)的氨基酸F11、F14和W15的表位。在本发明的优选的双互补位多肽(如双互补位纳米抗体)中,第二抗原结合结构域结合在人CXCR2外环中的表位(SEQ ID No.1的氨基酸残基106-120,184-208和274-294)。在本发明的一个实施方案中,所述表位是构象的。在本发明的实施方案中,所述表位包括SEQ ID No.1的氨基酸残基W112、G115、I282和T285。

[0031] 本发明还涵盖了编码根据本发明的任何多肽的核酸分子,以及编码其片段的核酸,如编码包含在双互补位纳米抗体内的单个纳米抗体的核酸。本发明还涵盖了包含本发明核酸的载体,和包含所述载体并能够表达根据本发明多肽的宿主细胞。

[0032] 在另一个方面,本发明涉及包含根据本发明的多肽与可药用的载剂、稀释剂或赋形剂的组合的药物组合物。由于本发明的多肽能够阻断、抑制或降低CXCR2的活性,因此其可用于治疗其中来自CXCR2的异常的信号转导发挥了作用的疾病。此类疾病可包括动脉粥样硬化、肾小球性肾炎、炎性肠病(克氏病)、血管发生、多发性硬化、银屑病、坏疽性脓皮病、衰老相关的黄斑退行性疾病、眼部白塞病、葡萄膜炎、非小细胞癌、结肠癌、胰腺癌、食道癌、黑素瘤、肝细胞癌或缺血灌注损伤。此类疾病还可以包括呼吸道的病况,如囊性纤维化、哮喘、严重哮喘、哮喘恶化、过敏性哮喘、嗜中性粒细胞性哮喘、急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征、特发性肺纤维化、气道重塑、细支气管炎闭塞综合征或支气管肺发育异常。

[0033] 在一个实施方案中本发明的多肽用于治疗哮喘,特别是严重哮喘和哮喘的恶化。

[0034] 在特别优选的实施方案中,本发明的多肽用于治疗慢性阻塞性肺病症(COPD)或COPD恶化,其特征是白细胞(特别是嗜中性粒细胞)向肺实质的迁移,和之后肺实质的破坏,所述迁移是通过CXCR2信号传递介导的。本发明的多肽阻断、抑制或降低CXCR2活性的能力使其成为用于预防或治疗该疾病的优秀候选对象。

[0035] 用于治疗人类,本发明的多肽优选针对或特异性结合人CXCR2。然而优选的是如果

所述多肽可以与灵长类CXCR2,特别是与食蟹猴CXCR2交叉反应,以便可以在所述猴子中进行恰当的毒性测试。如果考虑兽医学用途,则本发明的多肽可以针对或特异性结合来自其他物种的CXCR2同源物。

[0036] 由本文的其他讨论,本发明的其他方面是显而易见的。

附图简介

[0037] 图1显示了应答曲线,所述应答曲线是在增加的纳米抗体浓度下测量本发明的两个纳米抗体和双互补位纳米抗体阻断用激动剂Gro- α 刺激的CHO-CXCR2膜释放 $[^{35}\text{S}]\text{GTP } \gamma \text{ S}$ 的能力时获得的。

[0038] 图1a显示了纳米抗体54B12(表9中的SEQ ID No 90)的结果,图1b显示了纳米抗体163E3(表9中的SEQ ID No 42)的结果,图1c显示了双互补位纳米抗体54B12/163E3(表13中的SEQ ID No 68)的结果。

[0039] 图2通过GR0 α 的抑制-作为在多个GR0- α 浓度下%抑制相对抗体浓度显示了两个代表性纳米抗体127D1(图2a),163E3(图2b)和双互补位163E-35GS-127D1(图2c)的效能(potency)和功效(efficacy)。观察到127D1是有效能的,但不是有功效的,然而163E3具有较低的效能,但比127D1更有功效。当组合这两种结合分子时,显示获得的双互补位结合分子既有效能也有功效。

[0040] 图3显示测试本发明的代表性多肽对CXCR2的特异性高于对CXCR1的特异性的结果,如下表中所示。

[0041]

▲ 纳米抗体 A ▣ 纳米抗体 B ■ 纳米抗体 A-35GS-纳米抗体 B	▼ 纳米抗体 A ● 纳米抗体 B ◆ 纳米抗体 A-35GS-纳米抗体 B
表达人 CXCR2 受体的 RBL 细胞中 GRO α 诱导的钙应答的抑制	表达人 CXCR1 受体的 L2071 细胞中 IL-8 诱导的钙应答的抑制

[0042] 测试的纯化的单价抗CXCR2(A或B)或双互补位纳米抗体显示应答GR0 α 时对hCXCR2的nM效能,而应答IL-8诱导的胞内钙释放时对hCXCR1受体其在 μM 浓度处于活性。

[0043] 图4显示了具有AA C末端延伸79-76-A1b8-AA的双互补位半寿期延长的纳米抗体显著降低了抗Nb IgG反应性,在男性中从50%降低至20%,在女性中从61%降低至16%。此外,较之不具有C末端延伸79-76-A1b8和79-86-A1b8的纳米抗体,A1a-A1a C末端变体79-76-A1b8-AA和79-86-A1b8-AA未改变功能活性。

[0044] 图5显示了抗CXCR2纳米抗体,79-76-A1b8-AA对原始人嗜中性粒细胞对rhGR0- α 的趋化作用的作用。用不同浓度的抗CXCR2纳米抗体,79-76-A1b8-AA(●)在RT预孵育用钙黄绿素-AM标记的分离的原始人嗜中性粒细胞30min。然后将细胞加至3 μm 多孔插入板中并允许在接收板中在37 $^{\circ}\text{C}$ 进行对2nM rhGR0- α 的趋化作用90min。然后在BioTek Synergy平板阅读器上在485nm激发和520nm发射处测量已经迁移进入接收板的孔中的细胞的荧光。79-76-A1b8-AA抑制了rhGR0- α 刺激的趋化作用,IC₅₀值为 $0.256 \pm 0.02\text{nM}$ (来自n=4个供体的平均

值±SEM)。

[0045] 定义

[0046] 在本说明书中,实施例和权利要求:

[0047] a) 除非另外指出或定义,所使用的所有术语都具有其领域中的常规含义,对本领域技术人员是显而易见的。例如参考下文提及的标准手册。Sambrook等人,“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”(第2版),第1-3卷,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989);F.Ausubel等人编著,“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等人,“Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering”,第2版,University of California Press, Berkeley,CA(1981);Roitt等人,“Immunology”(第6版),Mosby/Elsevier,Edinburgh(2001);Roitt等人,Roitt's Essential Immunology,第10版,Blackwell Publishing,UK(2001);和Janeway等人,“Immunobiology”(第6版),Garland Science Publishing/Churchill Livingstone,New York(2005)。

[0048] b) 除非另外指出,术语“免疫球蛋白”或“免疫球蛋白序列”——不论在本文中是指重链抗体或指常规的四链抗体——作为一般性术语使用,包括全长抗体、其单条链,及其所有的部分、结构域或片段(包括但不限于抗原-结合结构域或片段,分别如 V_{HH} 结构域或 V_H/V_L 结构域)。此外,如本文中使用的,术语“序列”(例如术语中如“免疫球蛋白序列”、“抗体序列”、“可变结构域序列”、“ V_{HH} 序列”或“蛋白质序列”)一般应该理解为包括相关的氨基酸序列以及编码所述氨基酸序列的核酸序列或核苷酸序列,除非上下文需要更加限制性的解释。

[0049] c) 除非另外指出,术语“免疫球蛋白单可变结构域”作为一般性术语使用,包括但不限于抗原-结合结构域或片段,分别如 V_{HH} 结构域或 V_H 或 V_L 结构域。术语抗原-结合分子或抗原-结合蛋白质可互换的使用,并且也包括术语纳米抗体。免疫球蛋白单可变结构域还是轻链可变结构域序列(例如, V_L -序列),或重链可变结构域序列(例如, V_H 序列);更具体而言,其可以是源自常规的四链抗体的重链可变结构域序列,或源自重链抗体的重链可变结构域序列。因此,免疫球蛋白单可变结构域可以是结构域抗体,或适合用作结构域抗体的免疫球蛋白序列、单结构域抗体,或适合用作单结构域抗体的免疫球蛋白序列,“dAb”,或适合用作dAb的免疫球蛋白序列,或纳米抗体,包括但不限于 V_{HH} 序列。本发明包括不同来源的免疫球蛋白序列,包含小鼠、大鼠、兔、驴、人和骆驼科动物的免疫球蛋白序列。免疫球蛋白单可变结构域包括全人的、人源化的、其他的序列优化的或嵌合的免疫球蛋白序列。免疫球蛋白单可变结构域和免疫球蛋白单可变结构域的结构可认为——但不限于——由4个框架区“FR”组成,在本领域分别被称为“框架区1”或“FR1”;“框架区2”或“FR2”;“框架区3”或“FR3”;和“框架区4”或“FR4”;所述框架区被3个互补决定区或“CDR”打断,在本领域分别被称为“互补决定区1”或“CDR1”;“互补决定区2”或“CDR2”;“互补决定区3”或“CDR3”。

[0050] d) 除非另外指出,本领域技术人员显而易见的是,可以实施并按本身已知的方式实施没有以细节具体描述的所有方法、步骤、技术和操作。例如,可以还参考标准手册和本文提及的一般背景技术,以及其中引用的其他参考文献;以及参考例如下列综述Presta, Adv. Drug Deliv. Rev. 2006, 58 (5-6): 640-56; Levin和Weiss, Mol. Biosyst. 2006, 2 (1): 49-

57;Irving等人,J.Immunol.Methods,2001,248(1-2),31-45;Schmitz等人,Placenta,2000,21Suppl.A,S106-12,Gonzales等人,Tumour Biol.,2005,26(1),31-43,所述综述描述了用于蛋白改造的技术,如亲和力和成熟,和用于改善蛋白质(如免疫球蛋白)的特异性和其他所期望的性质的其他技术。

[0051] e) 根据标准的三字母或一字母氨基酸代码标注氨基酸残基。

[0052] f) 出于比较两个或多个核苷酸序列的目的,可以通过用[第一核苷酸序列中与第二核苷酸序列中的相应位置处的核苷酸相同的核苷酸数]除以[第一核苷酸序列中的核苷酸总数],再乘以[100%],或使用合适的计算机算法或技术,计算或确定在第一核苷酸序列和第二核苷酸序列之间的“序列同一性”百分比,其中相比第一核苷酸序列,第二核苷酸序列中的每个核苷酸缺失、插入、替换或添加被认为是单个核苷酸(位置)处的差异。可以使用已知的用于序列比对的计算机算法(如NCBI Blast v2.0),使用标准设置,计算两条或多条核苷酸序列之间的序列同一性程度。用于确定序列同一性程度的其他一些技术、计算机算法和设置描述在例如WO 04/037999、EP 0 967 284、EP 1 085 089、WO 00/55318、WO 00/78972、WO 98/49185和GB 2 357 768-A中。通常,出于根据上文概括的计算方法确定两条核苷酸序列之间的“序列同一性”的百分比的目的,以具有最大核苷酸数的核苷酸序列作为“第一”核苷酸序列,而将另一核苷酸序列作为“第二”核苷酸序列。

[0053] g) 出于比较两个或多个氨基酸序列的目的,可以通过用[第一氨基酸序列中与第二氨基酸序列中的相应位置处的氨基酸残基相同的氨基酸残基数]除以[第一氨基酸序列中的氨基酸总数],再乘以[100%],或使用合适的计算机算法或技术,计算或确定在第一氨基酸序列和第二氨基酸序列之间的“序列同一性”百分比(在本文中也被称为“氨基酸同一性”),其中相比第一氨基酸序列,第二氨基酸序列中的每个氨基酸缺失、插入、替换或添加被认为是单个氨基酸残基(位置)处的差异,即,本文定义的“氨基酸差异”。出于根据上文概括的计算方法确定两条氨基酸序列之间的“序列同一性”百分比的目的,以具有最大氨基酸数的氨基酸序列作为“第一”氨基酸序列,而将另一氨基酸序列作为“第二”氨基酸序列。

[0054] 此外,在确定两条氨基酸序列之间的序列同一性程度中,本领域技术人员可考虑所谓的“保守性”氨基酸替换,如下文v)中公开的。

[0055] 用于本文描述的多肽的任何氨基酸替换也可以基于由Schulz等人,Principles of Protein Structure,Springer-Verlag,1978研发的对不同物种的同源蛋白质之间的氨基酸变异的频率的分析,基于由Chou和Fasman,Biochemistry 13:211,1974和Adv.Enzymol.,47:45-149,1978研发的结构形成势能的分析,基于由Eisenberg等人,Proc.Nad.Acad Sci.USA 81:140-144,1984;Kyte&Doolittle;J Molec.Biol.157:105-132,1981和Goldman等人,Ann.Rev.Biophys.Chem.15:321-353,1986研发的蛋白质疏水性图式的分析,所有文献都通过引用全文整合到本文中。关于纳米抗体的一级和次级结构,例如由Desmyter等人,Nature Structural Biology,第3卷,9,803(1996);Spinelli等人,Natural Structural Biology(1996);3,752-757和Decanniere等人,Structure,第7卷,4,361(1999)给出了来自美洲驼的V_H结构域的晶体结构。

[0056] h) 当比较两条氨基酸序列时,术语“氨基酸差异”指相比第二序列,在第一序列的位置上插入、缺失或替换单个氨基酸残基;将理解两条氨基酸序列可以含有1、2或更多个此类氨基酸差异。

[0057] i) 当核苷酸序列或氨基酸序列分别被称为“包含”另一条核苷酸序列或氨基酸序列时,或被称为“基本由另一条核苷酸序列或氨基酸序列组成”时,这可以意指后一核苷酸序列或氨基酸序列已分别掺入到首先提及的核苷酸序列或氨基酸序列中,但更常见的是,这一般意指首先提及的核苷酸序列或氨基酸序列在其序列内分别包含一段核苷酸或氨基酸残基,所述一段核苷酸或残基分别与后一序列具有相同的核苷酸序列或氨基酸序列,而不论首先提及的序列实际上是如何产生或获得的(例如可以通过本文所述的任何合适的方法)。借助非限制性的实例,当本发明的双互补位免疫球蛋白单可变结构域(例如纳米抗体)被称为包含CDR序列时,这可以意指所述CDR序列已掺入到本发明的双互补位纳米抗体中,但更常见的是这一般意指本发明的双互补位纳米抗体在其序列内含有一段氨基酸残基,所述一段氨基酸残基与所述CDR序列具有相同的氨基酸序列,而不论所述双互补位纳米抗体是如何产生或获得的。还应注意,当后一氨基酸序列具有特定的生物学或结构学功能时,其优选具有与首先提及的氨基酸序列基本相同的、相似的或等价的生物学或结构学功能(换言之,首先提及的氨基酸序列优选地使后一序列能够实施基本相同的、相似的或等价的生物学或结构学功能的)。例如,当本发明的双互补位纳米抗体被称为分别包含CDR序列或框架序列时,所述双互补位纳米抗体中的CDR序列和框架优选能够分别作为CDR序列或框架序列发挥功能。再一次地,当核苷酸序列被称为包含另一条核苷酸序列时,首先提到的核苷酸序列优选是使得当其表达成表达产物(例如多肽)时,由后一核苷酸序列编码的氨基酸序列形成所述表达产物的一部分(换言之,后一核苷酸序列与首先提到的较大的核苷酸序列处于相同的读框)。

[0058] j) 当核酸序列或氨基酸序列已经与在所述源或基质中通常与其相关的至少一种其他组分(如另一种核酸、另一种蛋白质/多肽、另一种生物学组分或大分子、或至少一种污染物、杂质或微量组分)分离时,认为所述序列“(处于)基本分离的(形式)”——例如,相比从中获得所述核酸序列或氨基酸序列的天然生物学源和/或反应基质或培养基。特别的是,当已经被纯化至少2倍,特别是至少10倍,更特别的是至少100倍,和高达1000倍或更多倍时,认为核酸序列或氨基酸序列是“基本分离的”。“处于基本分离的形式的”核酸序列或氨基酸序列优选是基本均质的,如使用合适的技术,例如合适的层析技术,例如聚丙烯酰胺凝胶电泳所确定的;

[0059] k) 如本文中使用的,术语“抗原结合结构域”指免疫球蛋白中的氨基酸序列,所述氨基酸序列包含至少一个CDR,且具有识别靶抗原决定簇或表位的构象。

[0060] l) 术语“抗原决定簇”和“表位”在本文中也可以互换的使用,指在靶CXCR2中被抗原结合结构域识别的氨基酸序列,不论是处于线性或非线性构象。

[0061] m) 对于特定抗原决定簇、表位、抗原或蛋白质(或至少其一部分、片段或表位),可以(特异性)结合、具有亲和力和/或具有特异性的本发明多肽(例如本文所述双互补位纳米抗体或其片段),被称为“针对”所述抗原决定簇、表位、抗原或蛋白质。

[0062] n) 术语“特异性”指本发明的特定抗原结合结构域可以结合的不同类型的抗原或抗原决定簇的数量。可以基于亲和力(affinity)和/或亲合力(avidity),确定抗原结合蛋白质对于任何特别的抗原/表位的特异性,如WO 08/020079的第53-56页所述(通过引用整合到本文中),其还描述了用于测量多肽与相关抗原或表位之间的结合的一些优选的技术。通常,在每个抗原结合蛋白(如本发明的多肽)中,每个抗原结合结构域可以分别以 10^{-5} 至

10^{-12} 摩尔/升或更低,优选 10^{-7} 至 10^{-12} 摩尔/升或更低,更优选 10^{-8} 至 10^{-12} 摩尔/升的解离常数(K_D) (即,以 10^5 至 10^{12} 升/摩尔或更大,优选 10^7 至 10^{12} 升/摩尔或更大,更优选 10^8 至 10^{12} 升/摩尔的缔合常数(K_A))独立地结合其抗原/表位。任何大于 10^4mol/升 的 K_D 值(或任何低于 10^4M^{-1} 的 K_A 值)一般被认为表示非特异性的结合。优选的,本发明的双互补位多肽将以低于500nM,优选低于200nM,更优选低于10nM,如低于500pM的亲和力结合理想的抗原。可以通过任何本身已知的合适方式(包括例如Scatchard分析和/或竞争性结合测定,如放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定(EIA)和夹心竞争测定)和本领域中本身已知的不同变体;以及本文提及的其他技术,确定本发明的多肽与CXCR2的特异性结合。对本领域技术人员显而易见的,并如WO 08/020079的第53-56页所述,解离常数可以是实际解离常数或表观解离常数。确定解离常数的方法对本领域技术人员而言是显而易见的,例如包括WO 08/020079的第53-56页提及的技术。

[0063] o) 本发明的多肽,特别是根据本发明的双互补位纳米抗体的半寿期,一般可以定义为本发明的多肽的体内血清浓度降低至50% (例如由于多肽降解和/或清除,或者由于天然机制对多肽的隔离) 所花费的时间。可以通过任何本身已知的方式确定本发明的多肽的体内半寿期,如通过药代动力学分析。合适的技术对本领域技术人员是显而易见的,一般描述在例如WO 08/020079的第57页的第o) 节。在WO 08/020079的第57页中还提及可以使用参数,如 $t_{1/2-\alpha}$ 、 $t_{1/2-\beta}$ 和曲线下方面积(AUC) 表达半寿期。参照例如下文的实验部分,以及标准手册,如Kenneth, A等人:Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists和Peters等人,Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996)。还参照Marcel Dekker出版的“Pharmacokinetics”, M Gibaldi & D Perron, 第2次修订版(1982)。术语“半寿期增加”或“增加的半寿期”指 $t_{1/2-\beta}$ 的增加,有或没有 $t_{1/2-\alpha}$ 和/或AUC或两者的增加。

[0064] p) 在本发明的上下文中,使用合适的体外、细胞或体内测定测量的“阻断、降低或抑制”CXCR2的活性可意指较之在相同条件但不存在本发明的多肽下的相同测定中的CXCR2活性,阻断、降低或抑制CXCR2的相关或预期的生物学活性的活性至少1%, 优选至少5%, 如至少10%或至少25%, 例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%, 或90%或更多。

[0065] 对本领域技术人员显而易见的是,抑制还可以涉及造成CXCR2对一种或多种其配体或结合搭档的亲和力、亲合力、特异性和/或选择性的减少,和/或较之在相同条件但不存在本发明的多肽下,造成CXCR2对其中存在CXCR2的基质或环境中的一种或多种条件的灵敏度减少(如pH、离子强度、存在辅助因子等)。对本领域技术人员显而易见的是,取决于所涉及的靶或抗原,仍然可以以任何合适的方式和/或使用任何本身已知的合适测定来对此进行确定。

[0066] q) 如本文中使用的,“调节”可以意指CXCR2的变构调节;和/或降低或抑制CXCR2与其配体之一的结合和/或与天然配体竞争结合CXCR2。调节还可以涉及例如造成关于CXCR2的折叠或构象的改变,或者造成关于CXCR2改变其构象(例如,与配体结合时)、关联其他(亚)基或解离的能力的改变。调节还可以涉及例如造成CXCR2运输其他化合物或作为其他化合物(如离子)的通道的能力的改变。

[0067] 本发明的多肽,特别是本发明的双互补位纳米抗体对CXCR2活性的调节,特别是抑制或降低CXCR2活性,可以是可逆的或不可逆的,但出于制药或药理学的目的,通常是可逆

的方式。

[0068] r) 当本发明的多肽结合CXCR2的亲合力(如上所述,适当的表示为 K_D 值、 K_A 值、 K_{off} 速率和/或 K_{on} 速率)是其结合第二靶或多肽的亲合力的至少10倍,如至少100倍,并优选至少1000倍,并多达10,000倍或更多时,本发明的多肽被称为是较之第二靶或抗原“对CXCR2特异性的”。例如,本发明的多肽可以以这样的 K_D 值结合CXCR2,所述 K_D 值比其结合另一种靶或多肽或其表位的 K_D 的低至少10倍,如低至少100倍,并优选低至少1000倍,如低10,000倍,或者甚至更低。

[0069] s) 术语“交叉阻断”,“被交叉阻断的”和“交叉阻断的”可互换的使用,在本文中意指免疫球蛋白单可变结构域或多肽干扰本发明的其他免疫球蛋白单可变结构域或多肽与给定靶结合的能力。可以使用竞争结合测定,确定本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽能够干扰与另一种靶结合并因此根据本发明可以被称为交叉阻断的程度。一种特别合适的定量交叉阻断测定使用基于FACS的方法或基于ELISA的方法,来测量根据本发明的经标记的(例如,His-标记的、放射性或荧光标记的)免疫球蛋白单可变结构域或多肽与其他结合剂之间在它们与靶结合方面的竞争。实验部分一般描述了合适的基于FACS和ELISA替代的测定,用于确定结合分子是否交叉阻断或能够交叉阻断根据本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽。可理解的是,测定可以使用本文描述的任何免疫球蛋白单可变结构域或其他结合剂。因此,一般而言,根据本发明的交叉阻断的氨基酸序列或其他结合剂是这样的氨基酸序列或结合剂,其在上述交叉阻断测定中将结合靶,如此使得在测定期间和存在本发明的第二氨基酸序列或其他结合剂的条件下,根据本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽的记录替代在待测试的潜在交叉阻断剂(例如,其他抗体片段、 V_{HH} 、dAb或相似的 V_H/V_L 变体)的最大理论替代的50%和100%之间。

[0070] t) 如果根据本发明的多肽对这两种不同的抗原或抗原决定簇都是特异性的,则根据本发明的多肽被称为是对于两种不同的抗原或抗原决定簇(如来自两种不同的哺乳动物物种(如人和食蟹猴)的血清白蛋白或CXCR2)“交叉反应的”。

[0071] u) 如本文定义的,保守性氨基酸改变指这样的氨基酸替换,在所述氨基酸替换中,氨基酸残基被另一种具有相似化学结构的氨基酸残基替换,并对多肽的功能、活性或其他生物学性质只有极少或基本没有影响。此类保守性氨基酸替换是本领域普遍已知的,例如来自WO 04/037999、GB-A-3 357 768、WO 98/49185、WO 00/46383和WO 01/09300;并且可以基于WO 04/037999和WO 98/49185及其中引用的其他参考文献的相关教导,选择此类替换的(优选的)类型和/或组合。

[0072] 此类保守性替换优选是这样的替换,在所述替换中,下列组(a)-(e)中的一个氨基酸被同一组中的另一个氨基酸残基替换:(a) 小的脂肪族的、无极性或低极性的残基:Ala、Ser、Thr、Pro和Gly;(b) 极性的、带负电的残基及其(不带电荷的)酰胺:Asp、Asn、Glu和Gln;(c) 极性的、带正电的残基:His、Arg和Lys;(d) 大的脂肪族的无极性的残基:Met、Leu、Ile、Val和Cys;和(e) 芳香族的残基:Phe、Tyr和Trp。

[0073] 特别优选的保守性替换如下:Ala替换为Gly或Ser;Arg替换为Lys;Asn替换为Gln或His;Asp替换为Glu;Cys替换为Ser;Gln替换为Asn;Glu替换为Asp;Gly替换为Ala或Pro;His替换为Asn或Gln;He替换为Leu或Val;Leu替换为He或Val;Lys替换为Arg、Gln或Glu;Met替换为Leu、Tyr或He;Phe替换为Met、Leu或Tyr;Ser替换为Thr;Thr替换为Ser;Trp替换为

Tyr; Tyr 替换为 Trp; 和/或 Phe 替换为 Val、He 或 Leu。

[0074] v) 如本文中使用的, CDR 是本发明的多肽的互补决定区。CDR 是一段氨基酸, 其单独或与一个或多个其他 CDR 组合确立了与本发明的多肽识别的 (一个或多个) 抗原或表位的互补性。CDR 是通过某些编号规则在氨基酸序列中鉴别的。对于权利要求和本文中的具体描述, 使用 Kabat 编号。

[0075] w) 如本文中使用的, FR 是框架区 (有时称为 FW)。框架区是位于一个或多个 CDR 侧翼的氨基酸段, 并支持 CDR 处于抗原或表位识别的正确三维构象。FR 不是靶抗原或表位特异性的, 但是是物种来源或免疫球蛋白分子的类型特异性的, 其中 FR 存在于所述免疫球蛋白分子中。如本文详细讨论的, 在本发明的多肽中, 有框架区的氨基酸序列被改造为不同于例如骆驼科动物免疫球蛋白来源所应用的框架序列的范围。

[0076] x) 如本文中使用的, CXCR2 指至少存在于白细胞表面上的细胞因子受体, 其天然存在的配体可以是 Gro- α 、 β 、 γ 、IL-8、ENA-78 或 GCP-2。CXCR2 在本文中一般指任何表现出 CXCR2 功能的蛋白质, 不论其物种来源。然而, 如本文中使用的, 人 CXCR2 指包含 SEQ ID No 1 中所示氨基酸序列或其任意的等位变体或其直系同源物的蛋白质, 食蟹猴 CXCR2 指包含 SEQ ID No 3 中所示氨基酸序列或其任意的等位变体或其直系同源物的蛋白质。

[0077] y) 如本文中使用的, “序列优化” 指出于保证可能不存在于天然序列中的特定性质或结构特征的目的, 促进氨基酸序列中的替换、插入或缺失。例如, 可以出于化学稳定化、改善生产能力、避免焦谷氨酸形成或氧化或异构化的目的, 进行此类替换、插入或缺失。实现可用于双互补位多肽 (特别是本发明的双互补位纳米抗体) 的此类性质中的优化的方法描述在 WO 2009/095235 中, 其通过引用整合到本文中。还可以出于以本文描述的方式人源化本发明的双互补位多肽的目的, 执行序列优化技术。因此, 当本文中使用时, 序列优化、序列优化的或经优化的序列时, 涵盖了对人源化替换或插入, 以及对部分或完全人源化的双互补位多肽, 优选双互补位纳米抗体的特定参照。

[0078] z) 如本文中使用的 “C 末端延伸” 指已经添加至多肽链的 C 末端的氨基酸残基。此类延伸是至少一个, 优选至少两个氨基酸残基长并且起遮蔽表位的作用, 所述表位否则可能与在一些个体的血清中发现的 IgG 分子相互作用。

[0079] 发明详述

[0080] 在第一个方面, 本发明提供包含 2 个免疫球蛋白抗原结合结构域的多肽, 所述多肽针对或结合趋化因子受体 CXCR2, 其中所述第一抗原结合结构域包含在来自源自骆驼科动物的重链抗体的单条重链的第一 V_H 结构域或其片段中, 或是其序列优化的, 包括人源化的变体, 并且所述第二抗原结合结构域包含在来自源自骆驼科动物的重链抗体的单条重链的第二 V_H 结构域或其片段中, 或是其序列优化的, 包括人源化的变体并且其中多肽的 C 末端包含至少一个额外的氨基酸残基的向抗原结合结构域的序列的延伸; 并且其中第一抗原结合结构域识别 CXCR2 上的第一表位并且第二抗原结合结构域识别 CXCR2 上的第二表位。

[0081] 应当理解本文公开的全部实施方案包含如上所述的向抗原结合结构域的 C 末端延伸, 不管其是否在任何给定的实施方案中具体讨论与否。本发明的多肽, 因此全部包含此类 C 末端延伸。

[0082] 本发明的优选的多肽包含能够结合由 SEQ ID No. 7 中所示氨基酸序列组成的线性肽的第一抗原结合结构域, 和不能结合或者以低亲和力结合所述线性肽的第二抗原结合结

构域。SEQ ID No 7是人CXCR2的前19个N末端氨基酸。

[0083] 在一个实施方案中,第一抗原结合结构域识别包含或在CXCR2的第1至19位氨基酸内的第一表位,并且所述第二抗原结合结构域识别位于在CXCR2上的第1至19位氨基酸以外的第二表位。

[0084] 重链抗体的单链可变区被称为V_H结构域,并且包含被称为纳米抗体的抗体片段。纳米抗体可以包含整个V_H结构域或其片段。对于重链抗体及其可变结构域的一般性描述,参考W008/020079的第59页提及的现有技术,和国际申请W006/040153的第41-43页提及的参考文献列表。V_H结构域具有多种独特的结构特征和功能性质,使分离的V_H结构域(以及与天然存在的V_H结构域具有相同的结构和功能特征的基于其的纳米抗体)和多肽含有与功能性抗原结合结构域或多肽相同的高度优势。特别地,V_H结构域(本质上已被“设计为”在不存在或不与轻链可变结构域有任何相互作用的条件下与抗原功能性结合)和纳米抗体可作为单个、相对小的功能性抗原结合结构单元、结构域或蛋白质发挥功能。如本文中使用的,术语纳米抗体不仅涵盖了天然存在的V_H结构域及其片段,而且涵盖了本文详细讨论的其变体和衍生物。

[0085] 在本发明的最优选的实施方案中,本发明的双互补位多肽是这样的多肽,其中所述第一抗原结合结构域包含在第一纳米抗体中,并且所述第二抗原结合结构域包含在第二纳米抗体中,并且所述第一和第二纳米抗体是通过接头连接的。

[0086] V_H结构域的结构可表示为:

[0087] FR-CDR-FR-CDR-FR-CDR-FR

[0088] 而本发明的双互补位多肽可具有下列结构之一:

[0089] i) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--接头--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8-EXT

[0090] ii) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--接头--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8--接头-HLE-EXT

[0091] iii) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--接头--HLE--接头--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8-EXT

[0092] iv) HLE—接头--FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4—接头--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8-EXT

[0093] 其中如果FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4包含第一抗原结合结构域,则FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8包含第二抗原结构域,而如果FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4包含第二抗原结构域,则FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8包含第一抗原结合结构域:HLE是提供增加的体内半寿期的结合单元并且EXT是至少一个额外的氨基酸残基的C末端延伸。

[0094] 因此,如本文中使用的,“根据本发明的双互补位纳米抗体”指包含通过接头连接的2个单纳米抗体的多肽。

[0095] 然而,本发明的双互补位纳米抗体可以在每个纳米抗体中仅包括一个CDR。如果是这样的化,则优选的CDR是CDR3和/或CDR6。然而,根据本发明的双互补位纳米抗体可以在N末端纳米抗体中包括CDR1、或CDR2、或CDR3、或CDR1和CDR2、或CDR1和CDR3、或CDR2和CDR3、或CDR1和CDR2和CDR3,并且可以在C末端纳米抗体中包括下列组合中的任一种:CDR4、或

CDR5、或CDR6、或CDR4和CDR5、或CDR4和CDR6、或CDR5和CDR6、或CDR4和CDR5和CDR6。如上所提示的,本发明的双互补位纳米抗体可以包括所有的CDR1、CDR2、CDR3、CDR4、CDR5和CDR6,每个CDR的侧翼是FR。

[0096] FR可以具有与骆驼科动物来源一致的氨基酸序列。然而,在优选的实施方案中,一个或多个FR至少具有一个序列优化的氨基酸替换,并且优选一个或多个,和更优选所有的FR是部分或完全人源化的。下文更详细的讨论了序列优化的替换。

[0097] 本文还提及,在第一和第二抗原结合结构域包含在不是纳米抗体而是上述常规抗体的结构域或片段(例如人抗体、结构域或片段)中的第一和第二免疫球蛋白单可变结构域中的本发明的实施方案中,可以用至少一种骆驼科动物化替换修饰其中的(一个或多个)CDR,并任选地生成完全骆驼科动物化的CDR。

[0098] 如本文进一步所述,单纳米抗体中的氨基酸残基总数可以在110-120的区间,优选112-115,最优选113。然而,应该注意纳米抗体的部分、片段、类似物或衍生物(如本文进一步所述)不特别受限于其长度和/或大小,只要此类部分、片段、类似物或衍生物满足本文概括的其他要求并且也优选地适合于本文描述的目的。

[0099] 如本文进一步所述,纳米抗体的氨基酸残基是根据由Kabat等人(“Sequence of proteins of immunological interest”,US Public Health Services,NIH Bethesda,MD,Publication No.91)给出的对V_H结构域的一般编号来编号的,在Riechmann和Muyldermans,J.Immunol.Methods2000Jun 23;240(1-2):185-195的文献中用于骆驼科动物的V_H结构域(参见例如该出版物的图2),并且因此纳米抗体的FR1可以包含第1-30位的氨基酸残基,纳米抗体的CDR1可以包含第31-35位的氨基酸残基,纳米抗体的FR2可以包含第36-49位的氨基酸,纳米抗体的CDR2可以包含第50-65位的氨基酸残基,纳米抗体的FR3可以包含第66-94位的氨基酸残基,纳米抗体的CDR3可以包含第95-102位的氨基酸残基,纳米抗体的FR4可以包含第103-113位的氨基酸残基。在本发明优选的双互补位纳米抗体中,N末端纳米抗体可以具有上述给定位置处的FR和CDR,而在纳米抗体的C末端纳米抗体FR5中可以包含第1-30位的氨基酸残基,纳米抗体的CDR4可以包含第31-35位的氨基酸残基,纳米抗体的FR6可以包含第36-49位的氨基酸,纳米抗体的CDR5可以包含第50-65位的氨基酸残基,纳米抗体的FR7可以包含第66-94位的氨基酸残基,纳米抗体的CDR6可以包含第95-102位的氨基酸残基,并且纳米抗体的FR8可以包含第103-113位的氨基酸残基。

[0100] 然而,将理解可以通过Kabat以外备选的编号系统鉴定抗体,特别是纳米抗体中的CDR和FR。这些包括Chothia、IMGT和AHO系统。通过分析序列,可以实现根据这些备选编号系统对表9、13、19、32、33和34中鉴别的任一条氨基酸序列的CDR或FR位置进行鉴别。出于该目的,参考下列网站:<http://www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/>、(Chothia);<http://imgt.cines.fr>(IMGT)和<http://www.bio.uzh.ch/抗体/index.html>(AHO)。具体而言,在本文所述的本发明的优选的双互补位纳米抗体中,可以通过Kabat以外备选的这些编号系统之一,定义CDR 1、2、3、4、5或6而仍将落入本发明的范围内。

[0101] 根据本发明的一些纳米抗体的Chotia CDR显示在表35中。

[0102] 纳米抗体可以是所谓的“V_H3类”(即,与V_H3类的人种系序列具有高度序列同源性的纳米抗体,如DP-47、DP-51或DP-29),所述纳米抗体优选用于构建本发明的双互补位纳米抗体。然而,应该注意,针对CXCR2的任何类型的纳米抗体,例如属于所谓的“V_H4类”的纳米抗

[0114] 在本文描述的本发明的所有方面,接头的基本性质是其具有允许第一和第二抗原结合结构域结合所述结合结构域在CXCR2上的相应表位的长度和构象。

[0115] 使用的(一种或多种)接头也可以赋予本发明的多肽一种或多种其他有利的性质或功能,和/或提供用于形成衍生物和/或附着官能团的一个或多个位点(例如,如本文所描述的用于本发明的双互补位纳米抗体的衍生物)。例如,含有一个或多个带电荷氨基酸残基的接头(参见国际申请WO 08/020079第48页的表A-2)可以提供改善的亲水性质,而形成或含有小表位或标签的接头可用于检测、鉴别和/或纯化的目的。再一次地,基于本文公开的内容,本领域技术人员能够确定用于本发明的具体多肽的最佳接头,任选地在一些限制性的常规实验后。

[0116] 当两种或多种接头用于本发明的多肽中时,这些接头可以是相同或不同的。再一次地,基于本文公开的内容,本领域技术人员能够确定用于本发明的具体多肽的最佳接头,任选地在一些限制性的常规实验后。

[0117] 现在已经令人惊讶地发现,一些个体的血清含有可能与本发明的CXCR2纳米抗体相互作用的IgG分子,尽管这些个体之前并未暴露于纳米抗体。现已发现这是由于IgG分子与人源化的Vh结构域中的构象表位,通常在抗体中被CH1结构域遮蔽的区域相互作用。为了克服这一问题,本发明提供了CXCR2特异性的双互补位纳米抗体,其包括C末端延伸。已发现此C末端延伸有效率地抑制IgG分子和纳米抗体之间的结合相互作用。本发明人已发现为了阻断此相互作用可以将多种C末端延伸(A,AA,AS,AST,ASTKP,GGGS)添加至纳米抗体序列。优选的C末端延伸是两个丙氨酸残基(AA)。

[0118] 通常,为了便于表达和生产,本发明的多肽将是线性多肽。然而,本发明在最广义的含义上不限于此。例如,当本发明的多肽包含3个或更多个纳米抗体时,可以通过使用具有3个或更多个“臂”的接头连接所述纳米抗体,每个“臂”连接一个纳米抗体,从而提供“星状”构建体。尽管通常是较不优选的,还可以使用环状构建体。

[0119] 特别的是,可以制备具有如上文定义的一个或多个接头的任意排列的两个或多个纳米抗体。例如,可以设想这样的双互补位、双特异性纳米抗体,所述纳米抗体包含2个针对或结合CXCR2的免疫球蛋白结合结构域,和一个或多个针对或结合人血清白蛋白(HSA)的免疫球蛋白结合结构域,所述HSA结合结构域可以包含在纳米抗体中,所述纳米抗体经由如本文定义的接头与CXCR2结合纳米抗体在任何位置,例如在两个CXCR2结合纳米抗体之间连接。

[0120] 本发明人已制备了根据本发明的双互补位多肽。多价和双互补位抗CXCR2纳米抗体的氨基酸序列显示在本文实施例中的表13中。其中,根据本发明特别优选的多肽是表13中命名为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和163E3、-2B2,以及127D1-97A9、54B12-97A9和97A9-127D1的双互补位纳米抗体,及其经序列优化的变体。所有这些双互补位纳米抗体含有包含能够结合由SEQ ID No.7中所示氨基酸序列组成的线性肽(CXCR2的氨基酸1-19)的第一抗原结合结构域的第一纳米抗体,和包含不能结合或者以低亲和力结合所述线性肽的第二抗原结合结构域的第二纳米抗体(参见表8)。根据本发明特别优选的是163D2-127D1、163E3-127D1、163E3-54B12、163D2-54B12、2B2-163E3、2B2-163D2、97A9-2B2和97A9-54B12。

[0121] 如本文中已经讨论的,理想地,本发明的优选的双互补位纳米抗体(包括命名为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或163E3/2B2的具体实施方案及其变体)在其框架区内具有至少1个序列优化的氨基酸替换,且所述框架区可以是例如部分或完全人源化的。理想地,序列优化的程度导致双互补位纳米抗体在框架区方面与SEQ ID No 58、59、62、63、64、65、47、61、53、54、46、69、68、67或66具有至少80-90%序列同一性。

[0122] 本发明的实施方案还包含这样的多肽,在所述多肽中,第一抗原结合结构域选自SEQ ID No.213、214、216和219,或与任一上述序列具有至少80%,如至少90%,例如至少95%同一性的多肽,并且第二抗原结合结构域选自SEQ ID No.215、217和218,或与任一上述序列具有至少80%,如至少90%,例如至少95%同一性的多肽。

[0123] (0079-0076)

[0124] 在本发明的一个实施方案中,多肽在所述单可变结构域的第二免疫球蛋白中含有包含SEQ ID No 141中所示氨基酸序列的CDR1,包含SEQ ID No 236中所示氨基酸序列的CDR2,和包含SEQ ID No 181中所示氨基酸序列的CDR3,并且多肽在所述单可变结构域的第一免疫球蛋白中还含有包含SEQ ID No 146中所示氨基酸序列的CDR4,包含SEQ ID No 237中所示氨基酸序列的CDR5,包含SEQ ID No 186中所示氨基酸序列的CDR6。在其他实施方案中,CDR1、CDR2、CDR3、CDR4、CDR5或CDR6的氨基酸序列与SEQ ID No 141、236、181、146、237或186中所示任一种氨基酸序列具有至少80%,如至少90%,例如至少95%的氨基酸同一性。

[0125] 在其他实施方案中,多肽包含仅在保守性氨基酸改变上不同于SEQ ID No.141、236、181、146、237或186中所示氨基酸序列的氨基酸序列。

[0126] 在其他实施方案中,多肽包含选自SEQ ID No.216或与SEQ ID No.216具有至少80%,如至少90%,例如至少95%同一性的多肽的第一抗原结合结构域,和选自SEQ ID No.217或与SEQ ID No.217具有至少80%,如至少90%,例如至少95%同一性的多肽的第二抗原结合结构域。

[0127] 仍然在其他实施方案中,多肽包含SEQ ID No.221。

[0128] (0079-0086)

[0129] 在本发明的一个实施方案中,多肽在所述单可变结构域的第二免疫球蛋白中含有包含SEQ ID No 141中所示氨基酸序列的CDR1,包含SEQ ID No 236中所示氨基酸序列的CDR2,和包含SEQ ID No 181中所示氨基酸序列的CDR3,并且多肽在所述单可变结构域的第一免疫球蛋白中还含有包含SEQ ID No 145中所示氨基酸序列的CDR4,包含SEQ ID No 165中所示氨基酸序列的CDR5,并包含SEQ ID No 185中所示氨基酸序列的CDR6。在其他实施方案中,CDR1、CDR2、CDR3、CDR4、CDR5或CDR6的氨基酸序列与SEQ ID No.141、236、181、145、165或185中所示任一种氨基酸序列具有至少80%,如至少90%,例如至少95%氨基酸同一性。

[0130] 在其他实施方案中,多肽包含仅在保守性氨基酸改变上不同于SEQ ID No.141、236、181、145、165或185中所示氨基酸序列的氨基酸序列。

[0131] 在其他实施方案中,多肽包含选自SEQ ID No.216或与SEQ ID No.216具有至少

80%，如至少90%，例如至少95%同一性的多肽的第一抗原结合结构域，和选自SEQ ID No.218或与SEQ ID No.218具有至少80%，如至少90%，例如至少95%同一性的多肽的第二抗原结合结构域。

[0132] 仍然在其他实施方案中，多肽包含SEQ ID No.222。

[0133] (0079-0061)

[0134] 在本发明的一个实施方案中，多肽在所述单可变结构域的第二免疫球蛋白中含有包含SEQ ID No 141中所示氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID No 236中所示氨基酸序列的CDR2，和包含SEQ ID No 181中所示氨基酸序列的CDR3，并且多肽在所述单可变结构域的第一免疫球蛋白中还含有包含SEQ ID No 143中所示氨基酸序列的CDR4，包含SEQ ID No 235中所示氨基酸序列的CDR5，和包含SEQ ID No 183中所示氨基酸序列的CDR6。在其他实施方案中，CDR1、CDR2、CDR3、CDR4、CDR5或CDR6的氨基酸序列与SEQ ID No.141、236、181、143、235或183中所示任一种氨基酸序列具有至少80%，如至少90%，例如至少95%的氨基酸同一性。

[0135] 在其他实施方案中，多肽包含仅在保守性氨基酸改变上不同于SEQ ID No.141、236、181、143、235或183中所述氨基酸序列的氨基酸序列。

[0136] 在其他实施方案中，多肽包含选自SEQ ID No.216或与SEQ ID No.216具有至少80%，如至少90%，例如至少95%同一性的多肽的第一抗原结合结构域，和选自SEQ ID No.215或与SEQ ID No.215具有至少80%，如至少90%，例如至少95%同一性的多肽的第二抗原结合结构域，所述第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域由具有SEQ ID No.220的接头分隔。

[0137] (0104-0076)

[0138] 在本发明的一个实施方案中，多肽在所述单可变结构域的第二免疫球蛋白含有包含SEQ ID No 151中所示氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID No 171中所示氨基酸序列的CDR2，包含SEQ ID No 191中所示氨基酸序列的CDR3，并且多肽在所述单可变结构域的第一免疫球蛋白中还含有包含SEQ ID No 146中所示氨基酸序列的CDR4，包含SEQ ID No 237中所示氨基酸序列的CDR5，和包含SEQ ID No 186中所示氨基酸序列的CDR6。在其他实施方案中，CDR1、CDR2、CDR3、CDR4、CDR5或CDR6的氨基酸序列与SEQ ID No.151、171、191、146、237或186中所示任一种氨基酸序列具有至少80%，如至少90%，例如至少95%氨基酸同一性。

[0139] 在其他实施方案中，多肽包含仅在保守性氨基酸改变上不同于SEQ ID No.151、171、191、146、237或186所述的序列的氨基酸序列。

[0140] 在其他实施方案中，多肽包含选自SEQ ID No.219或与SEQ ID No.219具有至少80%，如至少90%，例如至少95%同一性的多肽的第一抗原结合结构域，和选自SEQ ID No.217或与SEQ ID No.217具有至少80%，如至少90%，例如至少95%同一性的多肽的第二抗原结合结构域。

[0141] 仍然在其他实施方案中，多肽包含SEQ ID No.223。

[0142] (0104-0086)

[0143] 在本发明的一个实施方案中，多肽在所述单可变结构域的第二免疫球蛋白中含有包含SEQ ID No 151中所示氨基酸序列的CDR1，包含SEQ ID No 171中所示氨基酸序列的CDR2，和包含SEQ ID No 191中所示氨基酸序列的CDR3，并且多肽在所述单可变结构域的第

一免疫球蛋白中还含有包含SEQ ID No 145中所示氨基酸序列的CDR4,包含SEQ ID No 165中所示氨基酸序列的CDR5,和包含SEQ ID No 185中所示氨基酸序列的CDR6。在其他实施方案中,CDR1、CDR2、CDR3、CDR4、CDR5或CDR6的氨基酸序列与SEQ ID No.151、171、191、145、165或185中所示的任一种氨基酸序列具有至少80%,如至少90%,例如至少95%氨基酸同一性。

[0144] 在其他实施方案中,多肽包含仅在保守性氨基酸改变上不同于SEQ ID No.151、171、191、145、165或185中所示氨基酸序列的氨基酸序列。

[0145] 在其他实施方案中,多肽包含选自SEQ ID No.219或与SEQ ID No.219具有至少80%,如至少90%,例如至少95%同一性的多肽的第一抗原结合结构域,和选自SEQ ID No.218或与SEQ ID No.218具有至少80%,如至少90%,例如至少95%同一性的多肽的第二抗原结合结构域。

[0146] 仍然在另一实施方案中,多肽包含SEQ ID No.224。

[0147] (0104-0061)

[0148] 在本发明的一个实施方案中,多肽在所述单可变结构域的第二免疫球蛋白中含有包含SEQ ID No 151中所示氨基酸序列的CDR1,包含SEQ ID No 171中所示氨基酸序列的CDR2,和包含SEQ ID No 191中所示氨基酸序列的CDR3,并且多肽在所述单可变结构域的第一免疫球蛋白中还含有包含SEQ ID No 143中所示氨基酸序列的CDR4,包含SEQ ID No 235中所示氨基酸序列的CDR5,和包含SEQ ID No 183中所示氨基酸序列的CDR6。在其他实施方案中,CDR1、CDR2、CDR3、CDR4、CDR5或CDR6的氨基酸序列与SEQ ID No.151、171、191、143、235或183中所示任一种氨基酸序列具有至少80%,如至少90%,例如至少95%的氨基酸同一性。

[0149] 在其他实施方案中,多肽包含仅在保守性氨基酸改变上不同于SEQ ID No.151、171、191、143、235或183中所示氨基酸序列的氨基酸序列。

[0150] 在其他实施方案中,多肽包含选自SEQ ID No.219或与SEQ ID No.219具有至少80%,如至少90%,例如至少95%同一性的多肽的第一抗原结合结构域,和选自SEQ ID No.215或与SEQ ID No.215具有至少80%,如至少90%,例如至少95%同一性的多肽的第二抗原结合结构域,所述第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域由具有SEQ ID No.220的接头分隔。

[0151] 在另一个方面,本发明提供了多肽,并且特别是免疫球蛋白单可变结构域,如V_H结构域或纳米抗体,所述免疫球蛋白单可变结构域对于CXCR2结合是单价的,并且是本发明的双互补位多肽的构件,可被视为其生产过程中的中间物。优选的单价免疫球蛋白单可变结构域是具有表9中所示SEQ ID No 25-43和90的多肽,或与SEQ ID No 25-43和90的任一项具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%氨基酸序列同一性的多肽。

[0152] 优选的单价多肽是命名为137B7并包含SEQ ID No 36中所示氨基酸序列或与SEQ ID No 36具有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在优选的实施方案中,SEQ ID No 36的框架区具有一个或多个序列优化的氨基酸替换。其他优选的单价多肽是命名为127D1、2B2、54B12、97A9、163D2和163E3的多肽,包括在框架区经过序列优化的多肽。

[0153] 例如,127D1可包含SEQ ID No 37的氨基酸序列,其中已经产生了如表26中考虑的

一个或多个序列优化的氨基酸替换,并且优选地,多肽包含SEQ ID No 216中所示氨基酸序列。

[0154] 2B2可包含SEQ ID No 43的氨基酸序列,其中已经产生了如表20中考虑的一个或多个序列优化的替换,并且优选地,多肽包含SEQ ID No 213或214中所示氨基酸序列。

[0155] 54B12可包含SEQ ID No 90,其中已经产生了如表30中考虑的一个或多个序列优化的替换,并且优选地,多肽包含SEQ ID No 219中所示氨基酸序列。

[0156] 97A9可包含SEQ ID No 39,其中已经产生了如表22中考虑的一个或多个序列优化的替换,并且优选地,多肽包含SEQ ID No 215中所示氨基酸序列。

[0157] 163D2可包含SEQ ID No 41的氨基酸序列,其中已经产生了如表28中考虑的一个或多个序列优化的替换,并且优选地,多肽包含SEQ ID No 218中所示氨基酸序列。

[0158] 163E3可包含SEQ ID No 42中所示氨基酸序列,其中已经产生了如表24中考虑的一个或多个序列优化的替换,并且优选地,多肽包含SEQ ID No 217中所示氨基酸序列。

[0159] 本发明的这一方面还涵盖了单价多肽,特别是免疫球蛋白单可变结构域,如纳米抗体,所述纳米抗体能够交叉阻断具有SEQ ID No 58、59、62、63、64、65、47或61的任一项中所示氨基酸序列的多肽与CXCR2的结合。

[0160] 任何上述优选的单价纳米抗体,特别是137B7可用于本文所述用途中,例如治疗COPD。

[0161] 根据本发明的双互补位多肽,特别是上述优选的双互补位免疫球蛋白单可变结构域(包括其所有的骆驼科动物化和人源化的形式)是CXCR2的调节物并且特别地抑制CXC2信号转导。

[0162] 优选地,本发明的双互补位多肽,特别是双互补位免疫球蛋白单可变结构域中的CDR序列和FR序列使其:

[0163] -以 10^{-5} 至 10^{-12} 摩尔/升或更少,优选 10^{-7} 至 10^{-12} 摩尔/升或更少,更优选 10^{-8} 至 10^{-12} 摩尔/升的解离常数(K_D) (即,以 10^5 至 10^{12} 升/摩尔或更高,优选 10^7 至 10^{12} 升/摩尔或更高,更优选 10^8 至 10^{12} 升/摩尔的缔合常数(K_A))结合CXCR2;

[0164] 和/或使其:

[0165] -以在 $10^2\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 至约 $10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 之间,优选在 $10^3\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 和 $10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 之间,更优选在 $10^4\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 至 $10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 之间,如在 $10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 至 $10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 之间的 k_{on} -速率结合CXCR2;

[0166] 和/或使其:

[0167] -以在 1s^{-1} ($t_{1/2}=0.69\text{s}$) 和 10^{-6}s^{-1} 之间(提供具有 $t_{1/2}$ 为数天的几乎不可逆的复合物),优选在 10^{-2}s^{-1} 至 10^{-6}s^{-1} 之间,更优选在 10^{-3}s^{-1} 和 10^{-6}s^{-1} 之间,如在 10^{-4}s^{-1} 和 10^{-6}s^{-1} 之间的 k_{off} 速率结合CXCR2。

[0168] 优选地,存在于本发明的多肽和双互补位免疫球蛋白单可变结构域中的CDR序列和FR序列使其以低于500nM,优选低于200nM,更优选低于10nM,如低于500pM的亲和力结合CXCR2。

[0169] 特别的是,如本文实施例中所示,本发明的优选的双互补位纳米抗体能够以低于20nM的 IC_{50} 抑制Gro- α 与人CXCR2的结合。本发明的优选的双互补位纳米抗体还可以以低于100nM的 IC_{50} 抑制具有CXCR2的RBL细胞的激动剂诱导的(Gro- α) Ca释放。根据本发明的优选的双互补位纳米抗体还可以以低于50nM的 IC_{50} 抑制激动剂诱导(Gro- α)的CHO-CXCR2膜中

的 $[^{35}\text{S}]\text{GTP } \gamma \text{ S}$ 积累。本发明的优选的双互补位纳米抗体还可以以小于<1nm的IC50抑制暴露于Gro- α 的人白细胞形状改变,或以小于<2nm的IC50抑制食蟹猴的白细胞形状改变。

[0170] 根据本发明最优选的方面,本发明的双互补位多肽,如双互补位免疫球蛋白单可变结构域,例如本文描述的纳米抗体可交叉阻断具有SEQ ID No 1的氨基酸序列的CXCR2多肽与SEQ ID No 58、59、62、63、64、65、47或61中所示的任一种或所有多肽的结合。可以通过本领域技术人员普遍已知的的任何方法测量交叉阻断。

[0171] 用于制药用途,本发明的多肽优选针对人CXCR2,例如包含如SEQ ID No 1中所示氨基酸序列的多肽;而对于兽医学目的,本发明的多肽优选针对来自待治疗物种的CXCR2,或至少与来自待治疗物种的CXCR2交叉反应。

[0172] 此外,本发明的双互补位多肽可任选地,并且在至少2个结合CXCR2的抗原结合结构域之外,含有一个或多个结合其他表位、抗原、蛋白质或靶的其他结合位点或结构域。

[0173] 可以使用适合于提示多肽可用于治疗COPD或涉及异常CXCR2信号转导的任何其他疾病的任何本身已知的合适的体外测定、基于细胞的测定、体内测定和/或动物模型、或其任意的组合,测试本发明的多肽和包含本发明多肽的组合物的功效。合适的测定和动物模型对本领域技术人员是显而易见的。

[0174] 此外,根据本发明,针对人CXCR2的多肽可以表现出或不表现出与一种或多种其他暖血动物物种的CXCR2的交叉反应性。然而,优选地,针对人CXCR2的本发明的多肽表现出与一种或多种其他灵长类物种的CXCR2的交叉反应性(例如但不限于,猕猴属的猴子(特别是例如食蟹猴(*Macaca fascicularis*)和/或猕猴(*Macaca mulatta*)和狒狒(*Papio ursinus*)),出于毒性测试的目的。优选的交叉反应性是与食蟹猴的CXCR2。与疾病的动物模型,特别是用于与CXCR2相关的疾病和病症的动物模型中常用的一种或多种动物物种(例如,小鼠、大鼠、兔、猪或狗)的交叉反应性是理想的。在这一方面,对本领域技术人员显而易见的是,出于药物研发的观点,当存在这类交叉反应性时是有利的,因为这允许在此类疾病模型中测试针对人CXCR2的氨基酸序列和多肽。

[0175] 更一般地,与多个哺乳动物物种的CXCR2交叉反应的本发明的多肽通常对于兽医学应用的用途是有利的,因为允许在多个物种中使用同一多肽。

[0176] 优选地,本发明的双互补位多肽不与CXCR1或CXCR4交叉反应。

[0177] 在本发明的双互补位多肽中,至少一个抗原结合位点可针对相互作用位点,即,在所述位点处CXCR2可与另一种分子(例如,其天然的一种或多种配体)相互作用。

[0178] 双互补位多肽(例如,本发明的免疫球蛋白单可变结构域)可以使得第二抗原结合结构域不结合SEQ ID No 7的线性肽,所述SEQ ID No 7的线性肽识别包含或位于如SEQ ID No 8、9、10、11或12中所示的肽中的表位。此外,第一抗原结合结构域可识别包含或位于SEQ ID No 7的肽中的表位。

[0179] 在本发明的与食蟹猴CXCR2交叉反应的实施方案中,第一抗原结合结构域还识别包含或位于SEQ ID No 4的肽中的表位。此类实施方案中的第二抗原结合结构域可识别包含或位于SEQ ID No 5或6的肽中的表位。

[0180] 本发明的范围中还提供了双互补位多肽,特别是双互补位纳米抗体的类型,所述纳米抗体一般结合所有的天然存在的或合成的CXCR2类似物、变体、突变体、等位基因、部分和片段;或至少结合含有一个或多个抗原决定簇或表位的CXCR2的类似物、变体、突变体、等

位基因、部分和片段,所述抗原决定簇或表位与本发明的多肽在CXCR2(例如,在SEQ ID No 1的野生型CXCR2中)中结合的一个或多个抗原决定簇或表位基本相同。在此情况下,本发明的多肽可以结合此类类似物、变体、突变体、等位基因、部分和片段,所具有的亲和力和/或特异性与本发明的多肽结合(野生型)CXCR2的上述亲和力和特异性相同或不同(即,高于或低于)。

[0181] 此外,对本领域技术人员显而易见的是,双互补位的多肽结合CXCR2的亲合力比相应的单抗原结合结构域多肽高。

[0182] 还落入本发明范围内的是,在本文讨论的多种治疗环境中,使用双互补位多肽,特别是本发明的双互补位免疫球蛋白单可变结构域的部分、片段、类似物、突变体、变体、等位基因和/或衍生物,前提是它们总是包括与全长多肽等价的相关功能性结构域。此类部分、片段、类似物、突变体、变体、等位基因或衍生物可具有上文关于本发明的双互补位多肽所讨论的所有功能性特征。

[0183] 在另一个方面,本发明涉及双互补位免疫球蛋白单可变结构域,其任选的还包含一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元。此类其他基团、残基、部分、结合单元或氨基酸序列可为本发明的多肽提供或不提供其他功能,并可以修饰或不修饰其性质。

[0184] 例如,此类其他基团、残基、部分或结合单元可以是一条或多条其他的氨基酸序列,使得本发明是(融合)蛋白或(融合)多肽。在优选但不受限制的方面,所述一个或多个其他的基团、残基、部分或结合单元是免疫球蛋白序列。甚至更优选地,所述一个或多个其他的基团、残基、部分或结合单元选自结构域抗体、适合用作结构域抗体的氨基酸序列、单结构域抗体、适合用作单结构域抗体的氨基酸序列、“dAb”、适合用作dAb的氨基酸序列,或纳米抗体。

[0185] 备选地,此类基团、残基、部分或结合单元可以是例如化学基团、残基、部分,其本身可以是或不是生物学和/或制药活性的。例如,此类基团可以与本发明的一个或多个多肽连接,从而提供本发明的多肽的“衍生物”,如本文进一步所述。

[0186] 在此类构建体中,本发明的一个或多个多肽和一个或多个基团、残基、部分或结合单元可以彼此直接连接,和/或通过一个或多个合适的接头或间隔子连接。例如,当一个或多个基团、残基、部分或结合单元是氨基酸序列时,接头也可以是氨基酸序列,使得获得的构建体是融合(蛋白)或融合(多肽)。

[0187] 上文和此处的进一步说明显而易见地意味着本发明的双互补位多肽可用作形成本发明的其他多肽的“构件”,即,通过适当地组合它们与其他的基团、残基、部分或结合单元,以形成本文所述的多互补位和任选地多价或多特异性、二价/多价和双/多特异性的构建体。

[0188] 一般可以通过这样的方法制备本发明这一方面的多肽,所述方法包括至少一个恰当地连接本发明的一个或多个多肽与一个或多个其他基团、残基、部分或结合单元,任选地通过一个或多个合适的接头的步骤。

[0189] 在本发明的一个具体方面,修饰本发明的双互补位多肽,使其相比相应的未修饰的本发明的多肽,具有增加的半寿期。基于本文进一步公开的内容,一些优选的多肽对本领域技术人员将是显而易见的,例如包含经化学修饰以增加其半寿期的本发明的氨基酸序列或多肽(例如,通过PEG化、pasylation或hesylation);本发明的多肽可以包含用于结合血

清蛋白(如血清白蛋白)的至少一个额外的结合位点;或者本发明的多肽可以包含与至少一个部分(并且特别是至少一个氨基酸序列)相连接的至少一个氨基酸序列,所述部分增加本发明的多肽的半寿期。包含此类延长半寿期的部分或氨基酸序列的本发明的多肽的实例包括这样的多肽,所述多肽与一个或多个血清蛋白或其片段(如(人)血清白蛋白或其合适的片段)恰当地连接,或与可以结合血清蛋白的一个或多个结合单元恰当地连接(例如可以结合血清蛋白如血清白蛋白(如人血清白蛋白)、血清免疫球蛋白如IgG、或转铁蛋白的结构域抗体、适合用作结构域抗体的氨基酸序列、单结构域抗体、适合用作单结构域抗体的氨基酸序列、“dAb”、适合用作dAb的氨基酸序列,或纳米抗体);与Fc部分(如人Fc)或其合适的部分或片段连接的多肽。本发明还包括与可以结合血清蛋白的一个或多个小蛋白质或肽连接的本发明的多肽(例如但不限于WO 91/01743、WO 01/45746、WO 02/076489和由Ablynx N.V.提交于2006年12月5日的Ablynx N.V.的名为“Peptides capable of binding to serum proteins”的US临时申请(还参见PCT/EP2007/063348)中描述的蛋白质和肽。

[0190] 最广泛使用的用于增加制药蛋白质的半寿期和/或降低其免疫原性的技术之一包括附着合适的可药用的聚合物,如聚乙二醇(PEG)或其衍生物(如甲氧基聚乙二醇或mPEG)。一般而言,可以使用任何合适的PEG化形式,如本领域中用于抗体和抗体片段(包括但不限于(单)结构域抗体和ScFv)的PEG化;参考例如Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); Veronese和Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003); Harris和Chess, Nat. Rev. Drug. Discov., 2, (2003) 和WO 04/060965。用于蛋白质PEG化的多种试剂也是可商购的,例如购自Nektar Therapeutics, USA。

[0191] 优选使用定点PEG化,特别是通过半胱氨酸残基(参见例如Yang等人, Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003))。出于该目的,例如可以将PEG附着到本发明的双互补位纳米抗体中天然存在的半胱氨酸残基上。可以修饰本发明的双互补位多肽,从而适合导入一个或多个用于附着PEG的半胱氨酸残基,或者可以将包含一个或多个用于连接PEG的半胱氨酸残基的氨基酸序列融合至双互补位多肽的N-和/或C末端,均使用本领域技术人员本身已知的蛋白质改造技术。

[0192] 优选的,对于本发明的双互补位免疫球蛋白单可变结构域和多肽,使用分子量大于5000,如大于10,000且小于200,000,如小于100,000;例如在20,000-80,000范围内的PEG。

[0193] 可以对免疫球蛋白可变结构域和/或任何肽接头区域的一端或两端应用PEG化。合适的PEG化技术描述在EP 1639011中。

[0194] 作为PEG的备选物,可以通过被称为HES化作用的技术延长半寿期,所述技术涉及将羟乙基淀粉(HES)衍生物附着至本发明的多肽。使用的羟乙基淀粉是源自蜡质玉米淀粉的支链淀粉,其已经过酸水解修饰调节了分子量,并且其中葡萄糖残基已被羟乙基化。其他细节可获得自Pavisic R, 等人, Int J Pharm (2010) March 15, 387 (1-2): 110-9。

[0195] 一般而言,具有增加的半寿期的本发明的多肽的半寿期优选比相应的本发明多肽本身的半寿期长至少1.5倍,优选至少2倍,如至少5倍,例如至少10倍或多于20倍。例如,相比相应的本发明的多肽本身,具有增加的半寿期的本发明的多肽可具有增加了1小时以上,优选2小时以上,更优选6小时以上,如12小时以上,或甚至24、48或72小时以上的半寿期。

[0196] 在本发明的优选的方面,较之相应的本发明的多肽本身,本发明的此类多肽具有

增加了1小时以上,优选2小时以上,更优选6小时以上,如12小时以上,或甚至24、48或72小时以上的血清半寿期。

[0197] 在本发明的另一个优选的方面,本发明的多肽在人中表现出至少约12小时,优选至少24小时,更优选至少48小时,甚至更优选至少72小时或更长的血清半寿期。例如,本发明的多肽可具有至少5天(如约5-10天),优选至少9天(如约9-14天),更优选至少约10天(如约10-15天),或至少约11天(如约11-16天),更优选至少约12天(如约12-18天或更长),或大于14天(如约14-19天)的半寿期。

[0198] 本发明还涉及制备或产生如本文所述的本发明的多肽、核酸、宿主细胞和组合物的方法。

[0199] 一般而言,这类方法可包括以下步骤:

[0200] a) 提供多肽组、多肽集合或多肽文库;

[0201] b) 筛选所述多肽组、多肽集合或多肽文库中可以结合CXCR2和/或对CXCR2具有亲和力的氨基酸序列;和

[0202] c) 分离可以结合CXCR2和/或对CXCR2具有亲和力的(一种或多种)氨基酸序列。

[0203] 多肽组、多肽集合或多肽文库可以是(本文所述的)免疫球蛋白序列的组、集合或文库,如免疫球蛋白序列的初始组、集合或文库;免疫球蛋白序列的合成或半合成的组、集合或文库;和/或已经过亲和力成熟的免疫球蛋白序列的组、集合或文库。

[0204] 此外,在此类方法中,多肽的组、集合或文库可以是重链可变结构域(如V_H结构域或V_H结构域)的组、集合或文库或轻链可变结构域的组、集合或文库。例如,多肽的组、集合或文库可以是结构域抗体或单结构域抗体的组、集合或文库,或者可以是能够作为结构域抗体或单结构域抗体发挥功能的氨基酸序列的组、集合或文库。

[0205] 在该方法的优选的方面,多肽的组、集合或文库可以是免疫球蛋白序列的免疫组、集合或文库,例如源自哺乳动物,例如,用CXCR2或用基于CXCR2或源自CXCR2的合适的抗原决定簇(如其抗原性部分、片段、区域、结构域、环或其他表位)恰当免疫过的美洲驼。

[0206] 在上述方法中,可以在噬菌体、噬菌粒、核糖体或合适的微生物(如酵母)上展示肽或多肽的组、集合或文库,如以协助筛选。用于展示和筛选氨基酸序列(的组、集合或文库)的合适方法、技术和宿主生物对本领域技术人员是显而易见的,例如基于本文中的其他公开内容。还参考Hoogenboom在Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005)中的综述。

[0207] 在另一个方面,产生用于构建根据本发明的双互补位多肽的多肽的方法至少包括以下步骤:

[0208] a) 提供表达多肽的细胞集合或样品;

[0209] b) 筛选所述细胞集合或样品中表达可以结合CXCR2和/或对CXCR2具有亲和力的多肽的细胞;和

[0210] c) (i) 分离所述多肽;或(ii) 从所述细胞分离编码所述多肽的核酸序列,随后表达所述多肽。

[0211] 例如,当希望的多肽是免疫球蛋白序列时,细胞集合或样品可以是例如B细胞的集合或样品。在该方法中,细胞样品还可以源自哺乳动物,例如,用CXCR2或用基于CXCR2或源自CXCR2的合适的抗原决定簇(如其抗原性部分、片段、区域、结构域、环或其他表位)恰当免疫过的美洲驼。在一个特别的方面,所述抗原决定簇可以是胞外部分、区域、结构域、环或一

个或多个其他胞外表位。

[0212] 在制备本文定义的本发明的优选的双互补位纳米抗体中,用表达人CXCR2的哺乳动物细胞、表达食蟹猴CXCR2的哺乳动物细胞、编码全长人CXCR2的DNA、编码 Δ 1-17人CXCR2的DNA、编码食蟹猴CXCR2的DNA和表5中所示肽免疫美洲驼。

[0213] 可以以对本领域技术人员显而易见的任何合适方式实施上述筛选方法。参考例如EP 0 542 810、WO 05/19824、WO 04/051268和WO 04/106377。优选地使用流式细胞技术如FACS实施步骤b)的筛选。对此,参考例如Lieby等人,Blood,第97卷,第12期,3820 (2001)。

[0214] 在另一个方面,用于生产针对CXCR2的多肽的方法可至少包括以下步骤,所述多肽用于构建根据本发明的多肽:

[0215] a) 提供编码多肽的核酸序列的组、集合或文库;

[0216] b) 筛选所述核酸序列的组、集合或文库中编码可以结合CXCR2和/或对CXCR2具有亲和力的氨基酸序列的核酸序列;和

[0217] c) 分离所述核酸序列,然后表达所述多肽。在这类方法中,编码多肽的核酸序列的组、集合或文库可以是例如编码初始免疫球蛋白序列的组、集合或文库的核酸序列的组、集合或文库;编码合成或半合成的免疫球蛋白序列的组、集合或文库的核酸序列的组、集合或文库;和/或编码已经过亲和力成熟的免疫球蛋白序列的组、集合或文库的核酸序列的组、集合或文库。

[0218] 此外,在这类方法中,核酸序列的组、集合或文库可以编码重链可变结构域(如V_H结构域或V_H结构域)的组、集合或文库或轻链可变结构域的组、集合或文库。例如,核酸序列的组、集合或文库可以编码结构域抗体或单结构域抗体的组、集合或文库,或者可以编码能够作为结构域抗体或单结构域抗体发挥功能的氨基酸序列的组、集合或文库。

[0219] 在该方法的优选的方面,核酸序列的组、集合或文库可以是核酸序列的免疫组、集合或文库,例如源自用CXCR2或用基于CXCR2或源自CXCR2的合适的抗原决定簇(如其抗原性部分、片段、区域、结构域、环或其他表位)恰当免疫过的哺乳动物。在一个特定的方面,所述抗原决定簇可以是胞外部分、区域、结构域、环或一种或多种其他胞外表位。

[0220] 在生产本发明的多肽时,用如上所述的抗原免疫美洲驼。

[0221] 在上述方法中,可以在噬菌体、噬菌粒、核糖体或合适的微生物(如酵母)上展示核酸序列的组、集合或文库,例如以协助筛选。用于展示和筛选编码氨基酸序列的核苷酸序列(的组、集合或文库)的合适方法、技术和宿主生物对本领域技术人员是显而易见的,例如基于本文进一步公开的内容。还可参考Hoogenboom在Nature Biotechnology,23,9,1105-1116 (2005)中的综述。

[0222] 在另一个方面,用于生成针对CXCR2的多肽的方法可至少包括以下步骤,所述多肽可用于根据本发明的双互补位多肽:

[0223] a) 提供编码多肽的核酸序列的组、集合或文库;

[0224] b) 筛选所述核酸序列的组、集合或文库中编码这样的氨基酸序列的核酸序列,所述氨基酸序列可以结合CXCR2和/或对CXCR2具有亲和力,并且交叉阻断本发明的双互补位纳米抗体(例如由SEQ ID NO 58、59、62、63、64、65、47或61编码的一个)或被本发明的双互补位纳米抗体交叉阻断;和

[0225] c) 分离所述核酸序列,然后表达所述多肽。

[0226] 本发明还涉及通过上述方法,或备选地通过包括上述方法之一和额外地至少确定所述免疫球蛋白序列的核苷酸序列或氨基酸序列的步骤的方法获得的双互补位多肽;和以本身已知的方式表达或合成所述氨基酸序列,如通过在合适的宿主细胞或宿主生物中表达,或通过化学合成和从其中构建双互补位多肽。

[0227] 可以以如本领域技术人员显而易见的和下文详细讨论的任何合适的方式实施上述方法。参考例如EP 0 542 810、WO 05/19824、WO 04/051268和WO 04/106377。例如,步骤b)的筛选优选是使用流式细胞技术如FACS实施的。对此,参考例如Lieby等人,Blood,第97卷,第12期,3820(2001)。特别参考在Ablynx N.V的国际申请WO 06/079372中描述的所谓“Nanoclone™”技术。

[0228] 另一种用于获得针对CXCR2的V_H序列或纳米抗体序列的技术涉及恰当地免疫能够表达重链抗体的转基因哺乳动物(即,使得产生免疫应答和/或针对CXCR2的重链抗体),从含有所述V_H序列或纳米抗体序列(的编码核酸序列)的所述转基因哺乳动物获得合适的生物学样品(如血样、血清样品或B细胞样品),然后,使用任何本身已知的合适技术(如本文描述的任何方法或杂交瘤技术)从所述样品开始,生成针对CXCR2的V_H序列。例如,出于该目的,可以使用表达重链抗体的小鼠,和描述在WO 02/085945、WO 04/049794、WO 06/008548和Janssens等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.2006Oct 10;103(41):15130-5中的其他方法和技术。例如,此类表达重链抗体的小鼠可以表达具有任何合适的(单)可变结构域(如天然来源的(单)可变结构域(例如,人(单)可变结构域、骆驼科动物(单)可变结构域或鲨(单)可变结构域),以及例如合成或半合成的(单)可变结构域)的重链抗体。

[0229] 从天然存在的V_H序列或优选V_H序列开始获得用于本发明的纳米抗体和/或编码所述纳米抗体的核酸的其他合适方法和技术对本领域技术人员是显而易见的,并可包括例如在本文提及的WO 08/00279As的第64页提及的技术。

[0230] 可以通过其FR中的一个或多个“标志残基”表征V_H结构域或纳米抗体。标志残基是表征FR来自骆驼科动物(例如,美洲驼)来源的残基。因此,标志残基是替换,优选人源化替换的理想靶。

[0231] 根据Kabat编号,标志残基可以是处于纳米抗体中的第11、37、44、45、47、83、84、103、104或108位。在WO 2008/020079的第65-98页给出了此类框架序列和备选的标志残基(的合适的组合)的非限制性实例,所述页面以整体并入到本文中。还考虑本领域已知的其他人源化或部分人源化的序列,所述序列也涵盖在本发明中。

[0232] 如本文所讨论的,相比天然存在的人V_H结构域的相应框架区,特别是相比DP-47的相应框架区,用于本发明的纳米抗体可以在至少一个框架区中具有至少“一个氨基酸差异”(本文定义的)。更具体而言,根据本发明的一个非限制性的方面,相比天然存在的人V_H结构域的相应框架区,特别是相比DP-47的相应框架区,纳米抗体可以在至少一个标志残基处(包括第108、103和/或45位的残基)具有至少“一个氨基酸差异”(本文定义的)。通常,纳米抗体在FR2和/或FR4中的至少一个,特别是FR2和/或FR4中的至少一个标记残基处(再一次地,包括第108、103和/或45位的残基),与天然存在的V_H结构域具有至少一个此类氨基酸差异。

[0233] 此外,本发明的人源化纳米抗体可以是如本文定义的,但附带条件是相比天然存在的V_H结构域的相应框架区,其在至少一个框架区具有至少“一个氨基酸差异”(本文定义

的)。更具体而言,根据本发明的一个非限制性的方面,人源化纳米抗体或另外序列优化的纳米抗体可以是如本文定义的,但附带条件是相比天然存在的V_H结构域的相应框架区,其在至少一个标志残基处(包括第108、103和/或45位的残基)具有至少“一个氨基酸差异”(本文定义的)。通常,人源化或另外序列优化的纳米抗体在FR2和/或FR4中的至少一个,特别是FR2和/或FR4中的至少一个标志残基处(仍包括第108、103和/或45位的残基),可以与天然存在的V_H结构域具有至少一个此类氨基酸差异。

[0234] 根据本文公开的内容显而易见的是,使用本文定义的本发明的免疫球蛋白单可变结构域的天然或合成的类似物、突变体、变体、等位基因、同源物和直系同源物(本文中统称为“类似物”),特别是SEQ ID NO 58、59、62、63、64、65、47、61、53、54、46、69、68、67或66的双互补位纳米抗体的类似物也落入本发明的范围内。

[0235] 一般而言,相比本文定义的本发明的免疫球蛋白单可变结构域,此类类似物中可替换、缺失和/或添加一个或多个氨基酸残基。可以在一个或多个框架区和/或一个或多个CDR中进行此类替换、插入或缺失。当在一个或多个框架区进行此类替换、插入或删除时,可以在一个或多个标志残基处和/或框架残基中的一个或多个其他位置处进行,尽管在标志残基处的替换、插入或缺失一般是较不优选的(除非这些是本文描述的合适的人源化替换)。

[0236] 作为非限制性实例,替换可以是例如保守性替换(如本文所述)和/或氨基酸残基可以被天然存在于另一种V_H结构域的相同位置上的另一种氨基酸残基替换(参见WO 2008/020079中关于此类取代的一些非限制性实例),尽管本发明一般不限于此。因此,任何一个或多个这样的替换、缺失或插入或其任意组合包括在本发明的范围内,所述替换、缺失或插入或其任意组合改善了例如用于本发明的双互补位纳米抗体中的纳米抗体的性质,或者至少不过多地减弱本发明的希望的性质或希望的性质的平衡或组合(即,达到纳米抗体或双互补位纳米抗体不再适合其预期的用途的程度)。本领域技术人员一般能够基于本文的公开内容,和任选地在有限的常规实验后,例如涉及导入有限数量的可能的替换,和确定其对获得的纳米抗体的性质的影响,确定和选择合适的替换、缺失或插入,或其合适的组合。

[0237] 例如,并且根据用于表达本发明的双互补位纳米抗体或多肽的宿主生物,在本领域技术人员的能力范围内,可以以这样的方式设计此类缺失和/或替换,使得移除了一个或多个用于翻译后修饰的位点(如一个或多个糖基化位点)。备选地,可以设计替换或插入,使得导入一个或多个用于附着官能团的位点(如本文所述),例如允许位点特异性PEG化(同样如本文所述)。

[0238] 一般在本文中,为了确保天然序列中不存在的特别的性质或结构特征的目的,促进氨基酸序列中替换、插入或缺失,包括“人源化”替换,被称为“序列优化”。在这一方面,参考本文定义章节的项目(y)。

[0239] 类似物优选使其可以以本文中关于本发明的双互补位纳米抗体所定义的亲和力(合适地测量和/或表达为(实际或表观的)K_D-值、(实际或表观的)K_A-值、k_{on}-速率和/或k_{off}-速率,或备选地作为IC₅₀值,如本文另外所述)结合CXCR2。

[0240] 类似物还优选保留本文所述双互补位纳米抗体的有利性质。

[0241] 此外,根据一个优选的方面,类似物与SEQ ID No 58、59、62、63、64、65、47、61、53、54、46、69、68、67或66的双互补位纳米抗体之一具有至少70%,优选至少80%,更优选至少

90%，如至少95%或99%或更高的序列同一性；和/或优选具有最多20个，优选最多10个，甚至更优选最多5个，如4、3、2或仅1个氨基酸差异(如本文所述)。

[0242] 此外，类似物的框架序列和CDR优选根据本文定义的优选的方面。更一般而言，如本文所述，类似物将具有(a)第108位处的Q；和/或(b)第45位处的带电荷氨基酸或半胱氨酸残基，和优选第44位处的E，和更优选第44位处的E和第45位处的R；和/或(c)第103位处的P、R或S。

[0243] 本发明的双互补位 V_{HH} 结构域或纳米抗体的一类优选的类似物已经人源化(即，相比天然存在的纳米抗体的序列)。如上述，此类人源化一般涉及用人 V_H 结构域(如人 V_H3 结构域)的相同位置上存在的氨基酸残基，取代天然存在的 V_{HH} 序列中的一个或多个氨基酸残基。根据比较纳米抗体序列和天然存在的人 V_H 结构域序列，和根据本文已公开的W0 2008/020079的公开内容，除本文的表20、22、24、26、28和30具体公开以外的可能的人源化替换的实例和人源化取代的其他组合对本领域技术人员是显而易见的。

[0244] 一般而言，由于人源化的结果，本发明的免疫球蛋白单可变结构域，特别是纳米抗体可以变得更“类人”，但仍保留本文所述的本发明的纳米抗体的有利性质。其结果是，此类人源化纳米抗体可具有若干优点，如相比相应的天然存在的 V_{HH} 结构域降低的免疫原性。再一次地，基于本公开内容和任选地在有限的常规实验后，本领域技术人员能够进行人源化替换或合适的人源化替换的组合，所述替换或替换的组合优化或在由人源化替换提供的有利性质的一方面和天然存在的 V_{HH} 结构域的有利性质的另一方面之间实现理想的或合适的平衡。

[0245] 用于掺入本发明的双互补位纳米抗体中的纳米抗体可以在任何一个或多个框架残基处(如一个或多个(本文定义的)标志残基处或一个或多个其他框架残基处(即，非标志残基)或其任意的合适组合)合适地人源化。“P,R,S-103组”或“KERE组”的纳米抗体的一个优选的人源化替换是Q108成为L108。“GLEW组”纳米抗体也可以是由Q108成为L108替换的人源化，前体是至少一个其他的标志残基含有骆驼科动物(骆驼科化)替换(如本文定义的)。例如，如上所述，一类特别优选的人源化纳米抗体在第44-47位具有GLEW或GLEW-样序列；在第103位处具有P、R或S(特别是R)，并且在第108位处具有L。

[0246] 可以以任何本身已知的方式，例如使用W0 08/020079的第103和104页中提及的一种或多种技术，提供人源化和其他的类似物，和编码人源化和其他的类似物的核酸序列。

[0247] 如本文所述，对本领域技术人员显而易见的是，可以从人 V_H 序列(即，氨基酸序列或相应的核苷酸序列)设计和/或制备本发明的免疫球蛋白单可变结构域(包括其类似物)，如从人 V_H3 序列，如DP-47、DP-51或DP-29，即，通过导入一个或多个骆驼科动物化的替换(即，将所述人 V_H 结构域的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基改变为存在于 V_{HH} 结构域中相应位置处的氨基酸残基)，从而提供本发明的纳米抗体的序列和/或从而将纳米抗体的有利性质赋予给所获得的序列。再一次地，这一般可以使用前述章节提及的多种方法和技术来实施，使用人 V_H 结构域的氨基酸序列和/或核苷酸序列作为起点。

[0248] 一些优选但非限制性的骆驼科动物化替换可源自W0 2008/020079。还显而易见的是，在一个或多个标志残基处的骆驼科动物化替换比在一个或多个其他氨基酸位置处的替换对期望的性质一般具有更大的影响，尽管两者及其任意的合适的组合都包括在本发明的范围内。例如，可以导入已经赋予至少一些期望的特征的一个或多个骆驼科动物化替换，然

后导入进一步改善所述性质和/或赋予其他有利性质的其他骆驼科动物化替换。再一次地,本领域技术人员一般能够基于本文公开的内容,和任选地经过有限的常规实验,例如涉及导入有限数量的可能的骆驼科动物化替换,和确定是否获得或改善了免疫球蛋白单可变结构域的有利性质(即,相比原始的V_H结构域),确定和选择合适的骆驼科动物化替换,或骆驼科动物化替换的合适组合。然而,一般而言,此类骆驼科动物化替换优选使得获得这样的氨基酸序列,所述序列至少含有(a)第108位处的Q;和/或(b)第45位处的带电荷氨基酸或半胱氨酸残基,和优选地第44位处的E,和更优选的第44位处的E和第45位处的R;和/或(c)第103位处的P、R或S;和任选地一个或多个其他骆驼科动物化替换。更优选地,骆驼科动物化替换导致用于本发明的免疫球蛋白单可变结构域,和/或其类似物(如本文定义的),如人源化类似物,和/或优选地导致如前述章节定义的类似物。

[0249] 还可以通过掺入自然中稀有,但结构上与V_H结构域折叠相容的替换,从V_H结构域衍生免疫球蛋白单可变结构域(如纳米抗体)。例如但不限于,这些替换可以包括一个或多个以下替换:第35位处的Gly;第37位处的Ser、Val或Thr;第39位处的Ser、Thr、Arg、Lys、His、Asp或Glu;第45位处的Glu或His;第47位处的Trp、Leu、Val、Ala、Thr或Glu;第50位处的S或R(Barthelemy等人J Biol Chem.2008Feb 8;283(6):3639-54.Epub 2007Nov 28)。

[0250] 本发明还包含本发明的双互补位多肽的衍生物。此类衍生物一般可通过修饰获得,特别是通过化学和/或生物学(例如酶促)修饰本发明的双互补位多肽和/或形成本发明的双互补位多肽的一个或多个氨基酸残基获得。

[0251] 此类修饰的实例,以及可以以此类方式修饰的多肽序列中的氨基酸残基的实例(即,位于蛋白质骨架上,优选位于侧链上),可用于导入此类修饰的方法和技术,和此类修饰的潜在用途和优势,对本领域技术人员都是显而易见的。

[0252] 例如,这类修饰可涉及向本发明的双互补位多肽中导入(例如,通过共价连接或其他合适的方式)一个或多个官能团、残基或部分,特别是赋予本发明的双互补位多肽期望的性质或功能性的一个或多个官能团、残基或部分。这类官能团的实例对本领域技术人员是显而易见的。

[0253] 例如,此类修饰可包含导入(例如,通过共价结合或任何其他合适的方式)一个或多个这样的官能团,所述官能团增加本发明的多肽的半寿期、溶解性和/或吸附,降低本发明的多肽的免疫原性和/或毒性,消除或减轻本发明的多肽的任何不理想的副作用,和/或赋予本发明的双互补位纳米抗体和/或多肽其他有利的性质和/或减少不理想的性质;或两个或多个上述性质的任意组合。这类官能团和用于导入官能团的技术的实例对本领域技术人员是显而易见的,并且一般可包括本领域已知的所有官能团,以及本身已知的用于修饰制药蛋白质,特别是用于修饰抗体或抗体片段(包括ScFv和单结构域抗体)的官能团和技术,参考例如Pharmaceutical Sciences,第16版,Mack Publishing Co.,Easton,PA(1980)。这类官能团可以例如与本发明的双互补位多肽直接连接(例如共价地),或任选地通过合适的接头或间隔子连接,这同样对本领域技术人员仍然是显而易见的。

[0254] 另一种通常较不优选的修饰包含N-连接或O-连接的糖基化,通常作为共翻译和/或翻译后修饰的一部分,取决于用于表达本发明的双互补位纳米抗体或多肽的宿主细胞。

[0255] 另一种修饰可包括导入一个或多个可检测的标签或其他产生信号的基团或部分,取决于被标记多肽或纳米抗体的预期用途。合适的标签和用于附着、使用 and 检测所述标签

的技术对本领域技术人员是显而易见的,包括例如但不限于荧光标签、磷光标签、化学发光标签、生物发光标签、放射性同位素、金属、金属螯合物、金属阳离子、生色团和酶,如WO 08/020079的第109页所述。其他合适的标签对本领域技术人员是显而易见的,包括例如可使用NMR或ESR光谱检测的部分。

[0256] 这类经标记的本发明的双互补位纳米抗体和多肽可用于例如体外、体内或原位测定(包括本身已知的免疫测定,如ELISA、RIA、EIA和其他“夹心测定”等),以及体内诊断和成像目的,取决于对特定标签的选择。

[0257] 对本领域技术人员显而易见的是,另一种修饰可涉及导入螯合基团,例如螯合上述金属或金属阳离子中的一种。合适的螯合基包括但不限于例如二乙烯三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0258] 另一种修饰可包括导入官能团,所述官能团是特异性结合对,如生物素-(链霉)亲和素结合对的一部分。这类官能团可用于连接本发明的双互补位多肽或纳米抗体与结合了结合对的另一半的另一种蛋白质、多肽或化学化合物,即,通过形成结合对。例如,本发明的双互补位纳米抗体可以与生物素缀合,并与缀合了亲和素或链霉亲和素的另一种蛋白质、多肽、化合物或载体连接。例如,这类缀合的双互补位纳米抗体可用作报告子,例如在可检测的信号产生剂与亲和素或链霉亲和素缀合的诊断系统中。这类结合对也可以用于例如将本发明的双互补位纳米抗体与载体(包括适合制药目的的载体)结合。一个非限制性的实例是Cao和Suresh, *Journal of Drug Targetting*, 8, 4, 257 (2000) 描述的脂质体制剂。这类结合还可用于连接治疗活性剂与本发明的纳米抗体。

[0259] 对于一些应用,特别是对于其中预期杀死表达本发明的双互补位多肽或免疫球蛋白单可变结构域所针对的CXCR2靶的细胞的应用(例如,在癌症治疗中),或降低或减慢这类细胞的生长和/或增殖的应用,也可以连接本发明的双互补位多肽与毒素或毒性残基或部分。可以连接本发明的双互补位多肽从而提供-例如-细胞毒性化合物的毒性部分、化合物或残基的实例对本领域技术人员是显而易见的,可见于例如上文引用的现有技术和/或本文的其他说明中。一个实例是WO 03/055527中描述的所谓的ADEPT™技术。

[0260] 其他潜在的化学和酶促修饰对本领域技术人员是显而易见的。也可以出于研究目的(例如,研究功能-活性关系)导入这类修饰。参考例如Lundblad和Bradshaw, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 26, 143-151 (1997)。

[0261] 优选地,衍生物以本文关于本发明的双互补位纳米抗体定义的亲和力结合CXCR2(恰当地测量和/或表示为(实际或表观的) K_D -值、(实际或表观的) K_A -值、 k_{on} -速率和/或 k_{off} -速率,或备选地作为 IC_{50} 值,如本文另外所述)。

[0262] 如上所述,本发明还涉及基本由本发明的双互补位多肽组成的或包含至少一个本发明的双互补位多肽的蛋白质或多肽。“基本由……组成”意指本发明的多肽的氨基酸序列与本发明的双互补位多肽的氨基酸序列完全相同,或者与本发明此类多肽的氨基酸序列相对应,所述氨基酸序列在双互补位多肽的氨基酸序列的氨基端、羧基端、或在氨基端和羧基端添加了有限数量的氨基酸残基,如1-20个氨基酸残基,例如1-10个氨基酸残基,优选1-6个氨基酸残基,如1、2、3、4、5或6个氨基酸残基。

[0263] 所述氨基酸残基可以或可以不改变、可以或可以不变更或可以或可以不影响多肽的(生物学)性质,并且可以或可以不对多肽添加其他的功能性。例如,这类氨基酸残基:

[0264] -可以包含N末端Met残基,例如作为在异源宿主细胞或宿主生物中表达的结果。

[0265] -可以形成指导双互补位多肽在合成后从宿主细胞分泌的信号序列或前导序列。合适的分泌前导肽对本领域技术人员是显而易见的,可以如本文进一步所述。通常,此类前导序列可与双互补位多肽的N末端相连接;

[0266] -可以形成序列或信号,所述序列或信号允许双互补位多肽指向和/或穿透或进入特定的器官、组织、细胞、或细胞的部分或区室,和/或允许双互补位多肽穿透或跨过生物学屏障,如细胞膜、细胞层(如表皮细胞层)、肿瘤(包括实体肿瘤)或血脑屏障。这类氨基酸序列的实例对本领域技术人员是显而易见的,并且包括在WO 08/020079的第112页的第c)段提及的实例。

[0267] -可以形成“标签”,例如允许或促进双互补位纳米抗体纯化的氨基酸序列或残基,例如使用针对所述序列或残基的亲和技术。之后,可以移除所述序列或残基(例如,通过化学或酶促切割),以提供双互补位多肽序列(出于该目的,标签可以任选地通过可切割的接头序列与双互补位多肽序列连接,或含有可切割的基序)。这类残基的一些优选但非限制性的实例是多个组氨酸残基、谷胱甘肽残基和myc-标签(参见例如WO 06/12282的SEQ ID NO: 31)。

[0268] -可以是这样的—个或多个氨基酸残基,所述氨基酸残基已被功能化和/或可用作附着官能团的位点。合适的氨基酸残基和官能团对本领域技术人员是显而易见的,包括但不限于本文提及的用于本发明的双互补位多肽或纳米抗体的衍生物的氨基酸残基和官能团。

[0269] 根据另一个方面,本发明的双互补位多肽包含本发明的双互补位纳米抗体,所述双互补位纳米抗体在其氨基端、其羧基端、或在其氨基端和其羧基端与至少一种其他肽或多肽融合,即,从而提供包含本发明的所述双互补位纳米抗体和一种或多种其他肽或多肽的融合蛋白。这类融合体在本文中也被称为“纳米抗体融合体”。

[0270] 优选地,其他肽或多肽赋予本发明的双互补位纳米抗体或多肽一种或多种期望的性质或功能性。

[0271] 例如,其他肽或多肽还可以提供其他的结合位点,所述结合位点可以针对任何期望的蛋白质、多肽、抗原、抗原决定簇或表位(包括但不限于本发明的双互补位多肽所针对的相同的蛋白质、多肽、抗原、抗原决定簇或表位,或不同的蛋白质、多肽、抗原、抗原决定簇或表位)。

[0272] 这类肽或多肽的实例对本领域技术人员是显而易见的,一般可包含基于常规抗体及其片段的肽融合体中使用的所有的氨基酸序列(包括但不限于ScFv和单结构域抗体)。参考例如Holliger和Hudson, *Nature Biotechnology*, 23, 9, 1126-1136 (2005) 的综述。

[0273] 例如,这类肽或多肽可以是这样的氨基酸序列,相比本发明的多肽本身,所述氨基酸序列增加本发明的多肽的半寿期、溶解性或吸附,降低本发明的多肽的免疫原性或毒性,消除或减轻本发明的多肽的任何不期望的副作用,和/或赋予本发明的多肽其他有利的性质和/或减少不期望的性质。这类肽和多肽的一些非限制性的实例是血清蛋白,如人血清白蛋白(参见例如WO 00/27435)或半抗原分子(例如,循环抗体所识别的半抗原,参见例如WO 98/22141)。

[0274] 特别的是,本领域已描述了连接免疫球蛋白的片段(如V_H结构域)与血清白蛋白或

其片段,可以用于增加半寿期。参考WO 00/27435和WO 01/077137。根据本发明,本发明的双互补位多肽,优选双互补位纳米抗体优选是直接和血清白蛋白(或其合适的片段)连接的,或通过合适的接头,特别是合适的肽连接的,使本发明的多肽可以作为遗传融合体(蛋白质)表达。根据一个具体的方面,本发明的双互补位纳米抗体可以与至少包含血清白蛋白的结构域III或其部分的血清白蛋白片段相连。参考例如Ablynx N.V.的WO 07/112940。

[0275] 备选地,如本文已讨论的,其他肽或多肽可以提供针对血清蛋白(例如,人血清白蛋白或另一种血清蛋白,如IgG)的其他的结合位点或结合单元,从而提供增加的血清半寿期。这类氨基酸序列包括例如下述纳米抗体,以及WO 91/01743、WO 01/45746和WO 02/076489中描述的小肽和结合蛋白,和WO 03/002609和WO 04/003019中所述dAb。还参考Harmsen等人,Vaccine,23(41):4926-42,2005,以及EP 0 368 684,以及Ablynx N.V.的WO 08/028977、WO 08/043821、WO 08/043822,和Ablynx N.V.于2006年12月5日提交的名为“Peptides capable of binding to serum proteins”的美国临时申请(还参见PCT/EP2007/063348)。

[0276] 这类肽或多肽可以特别针对血清白蛋白(更特别的是人血清白蛋白)和/或针对IgG(更特别的是人IgG)。例如,这类氨基酸序列可以是针对(人)血清白蛋白的氨基酸序列,和可以结合(人)血清白蛋白上不参与血清白蛋白与FcRn的结合的氨基酸残基的氨基酸序列(参见例如WO 06/0122787),和/或能够与血清白蛋白上不形成血清白蛋白的结构域III的部分的氨基酸残基结合的氨基酸序列(同样参见例如WO 06/0122787);具有或可以提供增加的半寿期的氨基酸序列(参见例如Ablynx N.V.的WO 08/028977);与至少一种哺乳动物,特别是至少一种灵长类的血清白蛋白交叉反应的针对人血清白蛋白的氨基酸序列(所述灵长类例如但不限于猕猴属的猴子(特别是例如食蟹猴(*Macaca fascicularis*)和/或猕猴(*Macaca mulatta*))和狒狒(*Papio ursinus*)),同样参考WO 08/028977;可以以不依赖pH的方式结合血清白蛋白的氨基酸序列(参见例如Ablynx N.V.的名为“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”的WO 08/043821),和/或是条件性结合子的氨基酸序列(参见例如Ablynx N.V.的名为“Amino acid sequences that bind to a desired molecule in a conditional manner”的WO 08/043822)。

[0277] 根据另一个方面,一种或多种其他的肽、多肽或蛋白质序列可以包含常规4链抗体(特别是人抗体)和/或重链抗体的一个或多个部分、片段或结构域。例如,虽然通常较不优选,本发明的双互补位纳米抗体可以与常规的(优选人的) V_H 或 V_L 结构域连接,或与 V_H 或 V_L 结构域的天然或合成的类似物连接,也任选地通过接头序列(包括但不限于其他(单)结构域抗体,如Ward等人描述的dAb)连接。

[0278] 双互补位多肽或纳米抗体还可以与一个或多个(优选人的) C_H1 、 C_H2 和/或 C_H3 结构域连接,任选地通过接头序列连接。例如,与合适的 C_H1 结构域连接的双互补位纳米抗体可以例如与合适的轻链共同使用——以生成与常规Fab片段或 $F(ab')_2$ 片段类似的抗体片段/结构,但其中一个(在 $F(ab')_2$ 片段的情况下)或两个常规的 V_H 结构域都已被本发明的双互补位纳米抗体取代。此外,可以连接2个双互补位多肽与 C_H3 结构域(任选通过接头),以提供具有增加的体内半寿期的构建体。

[0279] 根据本发明的多肽的一个特定的方面,可以(任选通过合适的接头或铰链区)将本发明的一个或多个双互补位多肽或纳米抗体与一个或多个恒定结构域(例如,可用作Fc部分的一部分或用于形成Fc部分的2或3个恒定结构域)、Fc部分和/或一个或多个抗体部分、片段或结构域连接,所述抗体部分、片段或结构域赋予本发明的多肽一种或多种效应子功能,和/或可以赋予与一个或多个Fc受体结合的能力。例如,出于该目的,但不限于此,一个或多个其他肽或多肽可以包含抗体的一个或多个 C_H2 和/或 C_H3 结构域,所述 C_H2 和/或 C_H3 结构域如来自重链抗体(如本文所述),并更优选来自常规的人4链抗体;和/或可以形成(部分的)Fc区,例如来自IgG(例如来自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)、来自IgE或来自另一种人Ig如IgA、IgD或IgM。例如,WO 94/04678描述了包含骆驼科动物 V_{HH} 结构域或其人源化衍生物(即,纳米抗体)的重链抗体,其中骆驼科动物 C_H2 和/或 C_H3 结构域已被人 C_H2 和 C_H3 结构域取代,从而提供了由每条包含纳米抗体与人 C_H2 和 C_H3 结构域(但无 C_H1 结构域)的2条重链组成的免疫球蛋白,所述免疫球蛋白具有由 C_H2 和 C_H3 结构域提供的效应子功能,且所述免疫球蛋白可以在不存在任何轻链的条件下发挥功能。可以与本发明的纳米抗体适当连接从而提供效应子功能的其他氨基酸序列对本领域技术人员是显而易见的,并且可以基于期望的效应子功能来选择。参考例如WO 04/058820、WO 99/42077、WO 02/056910和WO 05/017148,以及Holliger和Hudson的综述,见上文。相比相应的本发明的多肽,本发明的多肽(例如纳米抗体)与Fc部分的偶联可以导致增加的半寿期。对于一些应用,使用赋予增加的半寿期而没有任何生物学显著的效应子功能的Fc部分和/或恒定结构域(即, C_H2 和/或 C_H3 结构域)也是合适的,甚至是优选的。包含一个或多个双互补位多肽(如纳米抗体)和一个或多个恒定结构域的、具有增加的体内半寿期的其他合适的构建体对本领域技术人员是显而易见的,并且可以包含例如与 C_H3 结构域相连,任选地通过接头序列相连的2个纳米抗体。一般而言,具有增加的半寿期的任何融合蛋白质或衍生物优选具有大于50kD的分子量,这是肾吸收的截断值。

[0280] 在另一个具体但非限制的方面,为了形成本发明的多肽,可以连接(任选通过合适的接头或铰链区)一个或多个本发明的氨基酸序列与天然存在的、合成的或半合成的恒定结构域(或其类似物、变体、突变体、部分或片段),所述恒定结构域具有降低的(或基本没有)自我缔合成二聚体的倾向(即,相比常规的4链抗体中天然存在的恒定结构域)。这类单体(即,不自我缔合的)Fc链变体或其片段对本领域技术人员是显而易见的。例如,Helms等人,J Biol Chem 19962717494描述了可用于本发明的多肽链中的单体Fc链变体。

[0281] 此外,这类单体Fc链变体优选仍然能够结合互补的或相关的一种或多种Fc受体(取决于其来源的Fc部分),和/或仍然具有其来源的Fc部分的一些或所有效应子功能(或处于仍然适合预期用途的降低的水平)。备选地,在本发明的这类多肽链中,单体Fc链可用于赋予多肽链增加的半寿期,在此情况下,单体Fc链也可以不具有或基本不具有任何效应子功能。

[0282] 其他肽或多肽还可以形成信号序列或前导序列,其指导本发明的双互补位纳米抗体或多肽在合成后从宿主细胞分泌(例如,根据用于表达本发明的多肽的宿主细胞,提供本发明的多肽的前肽、原肽、或前原肽形式)。其他肽或多肽还可以形成序列或信号,所述序列或信号允许双互补位多肽指向和/或穿透或进入特定的器官、组织、细胞、或细胞的部分或区室,和/或允许双互补位多肽穿透或跨过生物学屏障,如细胞膜、细胞层(如表皮细胞层)、

肿瘤(包括实体肿瘤)或血脑屏障。这类氨基酸序列的合适实例对本领域技术人员是显而易见的,例如包括但不限于WO 08/020079的第118页提及的。对于一些应用,特别是对于旨在杀死表达本发明的互补位多肽针对的靶的细胞的应用(例如,在癌症治疗中),或旨在降低或减慢这类细胞的生长和/或增殖的应用,也可以将本发明的双互补位多肽与(细胞)毒性蛋白质或多肽相连接。可以与本发明的纳米抗体连接以提供-例如-本发明的细胞毒性多肽的这类毒性蛋白和多肽实例对本领域技术人员是显而易见的,并可见于例如以上引用的现有技术 and/或本文的其他说明中。一个实例是WO 03/055527中描述的所谓的ADEPT™技术。

[0283] 根据一个任选但非限制的方面,所述一种或多种其他的肽或多肽包含至少一种其他的纳米抗体,从而以提供包含至少3个,如4、5或更多个纳米抗体的本发明的多肽,其中所述纳米抗体可任选地通过一个或多个接头序列(如本文定义)连接。

[0284] 最后,同样落入本发明范围内的是,本发明的双互补位多肽可以含有两种或多种纳米抗体,和一种或多种其他的肽或多肽(如本文所述)。

[0285] 对于含有两个或多个V_HH结构域的多价和多特异性的多肽和其制品,还参考Conrath等人,J.Biol.Chem.,第276卷,10.7346-7350,2001;Muyltermans,Reviews in Molecular Biotechnology 74(2001),277-302;以及参考例如WO 96/34103和WO 99/23221。本发明的一些特定的多特异性和/或多价多肽的其他一些实例可见于本文提及的Ablynx N.V.的申请。

[0286] 本发明的多特异性多肽的一个优选的实例包含至少一个本发明的双互补位纳米抗体和至少一个提供了增加的半寿期的纳米抗体。这类纳米抗体可以是例如针对血清蛋白,特别是人血清蛋白(如人血清白蛋白、甲状腺素结合蛋白、(人)转铁蛋白、纤维蛋白原、免疫球蛋白如IgG、IgE或IgM)的纳米抗体,或针对WO 04/003019列举的血清蛋白的纳米抗体。其中,可以结合血清白蛋白(并且特别是人血清白蛋白)或IgG(特别是人IgG,参见例如Muyltermans,见上文的综述中描述的纳米抗体VH-1)的纳米抗体是特别优选的(尽管例如,为了小鼠或灵长类中的实验,可以分别使用针对或与小鼠血清白蛋白(MSA)或来自所述灵长类的血清白蛋白交叉反应的纳米抗体。然而,对于制药用途,通常优选的是针对人血清白蛋白或人IgG的纳米抗体)。提供增加的半寿期且可用于本发明的多肽中的纳米抗体包括针对血清白蛋白的纳米抗体,描述在WO 04/041865、WO 06/122787和Ablynx N.V.的其他专利申请中,如上文所述。

[0287] 例如,用于本发明中的提供增加的半寿期的一些优选的纳米抗体包括,可以结合(人)血清白蛋白上的不参与血清白蛋白与FcRn的结合的氨基酸残基的纳米抗体(参见例如WO 06/0122787);能够结合血清白蛋白上的不形成血清白蛋白的结构域III的部分的氨基酸残基的纳米抗体(参见例如WO 06/0122787);具有或可以提供增加的半寿期的纳米抗体(参见例如本文提及的Ablynx N.V.的WO 08/028977);针对人血清白蛋白的纳米抗体,所述纳米抗体与来自至少一种哺乳动物,并且特别是至少一种灵长类(例如但不限于猕猴属的猴子(特别是例如食蟹猴(Macaca fascicularis)和/或猕猴(Macaca mulatta)和狒狒(Papio ursinus))的血清白蛋白交叉反应(参见例如Ablynx N.V.的WO 08/028977);可以不依赖pH的方式结合血清白蛋白的纳米抗体(参见例如本文提及的Ablynx N.V.的WO2008/043821),和/或是条件性结合子的纳米抗体(参见例如Ablynx N.V.的WO 08/043822)。

[0288] 提供增加的半寿期和可用于本发明的多肽中的一些特别优选的纳米抗体包括WO 06/122787中公开的纳米抗体ALB-1至ALB-10(参见表II和III),其中ALB-8(WO 06/122787中的SEQ ID NO:62)是特别优选的。

[0289] 根据本发明的特别方面,除两种或多种纳米抗体外,本发明的多肽还含有至少一种针对人血清白蛋白的纳米抗体。

[0290] 可以添加、附着或融合至本发明的双互补位多肽的其他额外的肽或多肽包括由脯氨酸、丙氨酸和丝氨酸(PAS序列)组成的聚合物。PAS序列可由200-600个残基构成并且导致显著增加的流体动力学体积,导致延长的血浆半寿期。还可以通过与如Schellenberger等人,(2009),Nature Biotechnology 27, No 12, 第1186-1190页所述的、被称为XTEN的864个氨基酸多肽融合来延伸本发明的双互补位多肽的血清半寿期。

[0291] 一般而言,含有一个或多个本发明的双互补位纳米抗体的具有增加的半寿期的本发明的任何多肽,和具有增加的半寿期的本发明的双互补位纳米抗体或此类多肽的任何衍生物,优选具有比本发明的相应纳米抗体本身的半寿期长至少1.5倍,优选至少2倍,如至少5倍,例如至少10倍或多于20倍的半寿期。例如,这类具有增加的半寿期的衍生物或多肽可具有比本发明的相应纳米抗体本身增加1小时以上,优选2小时以上,更优选6小时以上,如12小时以上,或者甚至24、48或72小时以上的半寿期。

[0292] 在本发明的优选但非限制性的方面,这类衍生物或多肽可在人中表现出至少约12小时,优选至少24小时,更优选至少48小时,甚至更优选至少72小时或更长的人血清半寿期。例如,这类衍生物或多肽可具有至少5天(如约5至10天),优选至少9天(如约9至14天),更优选至少约10天(如约10至15天),或至少约11天(如约11至16天),更优选至少约12天(如约12至18天或更多),或多于14天(如约14至19天)的半寿期。

[0293] 本发明的多特异性多肽的另一个优选但非限制性实例包含至少一个本发明的双互补位纳米抗体和至少一个这样的纳米抗体,所述纳米抗体将本发明的多肽指向和/或使其穿透或进入特定的器官、组织、细胞、或细胞的部分或区室,和/或允许纳米抗体穿透或跨过生物学屏障,如细胞膜、细胞层(如表皮细胞层)、肿瘤(包括实体肿瘤)或血脑屏障。这类纳米抗体的实例包括针对期望的器官、组织或细胞的特异性的细胞表面蛋白、标志物或表位(例如,与肿瘤细胞相关的细胞表面标志物)的纳米抗体,和WO 02/057445和WO 06/040153中描述的单结构域靶向抗体片段,其中FC44(WO 06/040153的SEQ ID NO:189)和FC5(WO 06/040154的SEQ ID NO:190)是优选的实例。

[0294] 在本发明的多肽中,两个或多个纳米抗体和一个或多个多肽可以直接彼此连接(例如WO 99/23221中所述),和/或通过一个或多个合适的间隔子或接头,或其任意的组合彼此连接。

[0295] 根据本发明的一个方面,本发明的多肽处于本文定义的基本分离的形式。

[0296] 可以以本身已知的方式制备本发明的氨基酸序列、双互补位纳米抗体、多肽和核酸,从本文中的其他描述这对于本领域技术人员是显而易见的。例如,可以以用于制备抗体,并且特别是用于制备抗体片段(包括但不限于(单)结构域抗体和ScFv片段)的任何本身已知的方式,制备本发明的双互补位纳米抗体和多肽。用于制备氨基酸序列、纳米抗体、多肽和核酸的一些优选但非限制的方法包括本文描述的方法和技术。

[0297] 对本领域技术人员显而易见的是,用于制备本发明的双互补位纳米抗体和/或多

肽的一种特别有效的方法一般包括步骤:

[0298] i) 在合适的宿主细胞或宿主生物(在本文中也称为“本发明的宿主”)中,或在另一种合适的表达体系中,表达编码本发明的所述双互补位纳米抗体或多肽的核酸(在本文中也称为“本发明的核酸”),然后任选地:

[0299] ii) 分离和/或纯化如此获得的本发明的所述双互补位纳米抗体或多肽。

[0300] 特别地,这类方法可包括步骤:

[0301] i) 在使所述本发明的宿主表达和/或生产至少一种本发明的双互补位纳米抗体和/或多肽的条件下,培养和/或维持本发明的宿主,然后任选地:

[0302] ii) 分离和/或纯化如此获得的本发明的双互补位纳米抗体或多肽。

[0303] 在另一个方面,本发明涉及编码本发明的多肽(或其合适的片段)的核酸分子。这类核酸在本文中也称为“本发明的核酸”,并可以是例如处于遗传构建体的形式,如本文中进一步所述。

[0304] 在优选的实施方案中,本发明提供了编码选自SEQ ID No 25至43、90和SEQ ID No 213-219中所示氨基酸序列的氨基酸序列的核酸分子,所述氨基酸序列涉及表9和32的具体的单个纳米抗体。备选地,根据本发明的核酸分子包含编码SEQ ID No 44至69的多价和双互补位纳米抗体构建体的核酸分子。此外,根据本发明的核酸分子包含具有涉及表18中鉴别的纳米抗体的SEQ ID No 192至211的核酸序列的分子。

[0305] 本发明的核酸可以处于单链或双链DNA或RNA的形式,优选处于双链DNA的形式。例如,本发明的核苷酸序列可以是基因组DNA、cDNA或合成DNA(如具有已经特别地适用于在预期的宿主细胞或宿主生物中表达的密码子使用的DNA)。

[0306] 根据本发明的一个方面,本发明的核酸处于基本分离的形式,如本文定义的。

[0307] 本发明的核酸还可以处于载体的形式、存在于载体中和/或是载体的一部分,如质粒、粘粒或YAC,其同样也处于基本分离的形式。

[0308] 可以基于本文给出的本发明多肽的氨基酸序列信息,以本身已知的方式制备或获得本发明的核酸,和/或可以从合适的天然来源分离本发明的核酸。为了提供类似物,例如可以对编码天然存在的V_H结构域的核苷酸序列进行定点诱变,从而提供编码所述类似物的本发明的核酸。对本领域技术人员还显而易见的是,为了制备本发明的核酸,也可以以合适的方式将若干核苷酸序列,如编码本发明多肽的至少一种核苷酸序列和例如编码一个或多个接头的核酸连接在一起。

[0309] 用于生成本发明的核酸的技术对本领域技术人员是显而易见的,例如可以包括但不限于自动化DNA合成;定点诱变;组合两个或多个天然存在的和/或合成的序列(或其两个或多个部分),导入导致表达截短的表达产物的突变;导入一个或多个限制性酶切位点(例如,以产生使用合适的限制性酶易于消化和/或连接的盒和/或区域),和/或使用一个或多个“错配的”引物,使用例如CXCR2的天然存在形式的序列作为模板,通过PCR反应导入突变。这些和其他技术对本领域技术人员是显而易见的,并再次参考标准手册,如Sambrook等人和Ausubel等人,见上文,以及下述实施例。

[0310] 本发明的核酸还可以处于遗传构建体的形式、存在于遗传构建体中和/或是遗传构建体的一部分。这类遗传构建体一般包含至少一条本发明的核酸,其任选地与本身已知的一个或多个遗传构建体的元件连接,例如一个或多个合适的调控元件(如一个或多个合

适的启动子、增强子、终止子等)和本文所述的其他遗传构建体元件。包含至少一个本发明的核酸的此类遗传构建体在本文中也称为“本发明的遗传构建体”。

[0311] 本发明的遗传构建体可以是DNA或RNA,并优选是双链DNA。本发明的遗传构建体还可以处于适合转化预期的宿主细胞或宿主生物的形式,处于适合整合到预期的宿主细胞的基因组DNA中的形式,或处于适合在预期的宿主生物中独立复制、维持和/或继承的形式。例如,本发明的遗传构建体可以处于载体的形式,例如质粒、粘粒、YAC、病毒载体或转座子。特别的是,载体可以是表达载体,即,可供体外和/或体内表达的载体(例如,在合适的宿主细胞、宿主生物和/或表达系统中)。

[0312] 在优选但非限制的方面,本发明的遗传构建体包含:

[0313] i) 至少一个本发明的核酸;有效连接于

[0314] ii) 一个或多个调控元件,如启动子,和任选地合适的终止子;并且还任选地

[0315] iii) 本身已知的一个或多个其他的遗传构建体元件;

[0316] 其中,术语“有效相连的”和“有效连接的”具有WO 08/020079的第131-134页给出的含义;并且其中“调控元件”、“启动子”、“终止子”和“其他的元件”如WO 08/020079的第131-134页所述;并且其中,遗传构建体可进一步如WO 08/020079的第131-134页所述。

[0317] 本发明的核酸和/或本发明的遗传构建体可用于转化宿主细胞或宿主生物,即,用于表达和/或生产本发明的双互补位纳米抗体或多肽。合适的宿主或宿主细胞对本领域技术人员是显而易见的,可以是例如任何合适的真菌、原核或真核的细胞或细胞系、或任何合适的真菌、原核或真核的生物,例如WO 08/020079的第134和135页中所述的那些;以及本身已知的用于表达和生产抗体和抗体片段(包括但不限于(单)结构域抗体和ScFv片段)的所有其他宿主或宿主细胞,这对本领域技术人员是显而易见的。还参考上述一般的现有技术,以及例如参考WO 94/29457;WO 96/34103;WO 99/42077;Frenken等人,(1998),见上文;Riechmann和Muyldermans,(1999),见上文;van der Linden,(2000),见上文;Thomassen等人,(2002),见上文;Joosten等人,(2003),见上文;Joosten等人,(2005),见上文;和本文引用的其他文献。

[0318] 还可以在多细胞生物的一个或多个细胞、组织或器官中导入和表达本发明的双互补位纳米抗体和多肽,例如处于预防和/或治疗的目的(例如,作为基因疗法),如WO 08/020079的第135和136页,和WO 08/020079中引用的其他参考文献所述。

[0319] 为了在细胞中表达纳米抗体,还可以作为所谓的“胞内抗体(intrabody)”表达,例如WO 94/02610、WO 95/22618和US-A-7004940;WO 03/014960;Cattaneo,A.&Biocca,S.(1997) Intracellular Antibodies:Development and Applications.Landes and Springer-Verlag;和Kontermann,Methods 34,(2004),163-170中所述。

[0320] 也可以在例如转基因哺乳动物的乳汁中,例如兔、牛、山羊或绵羊的乳汁(参见例如US-A-6,741,957、US-A-6,304,489和US-A-6,849,992,关于向哺乳动物中导入转基因的一般技术);在植物或植物的部分中,包括但不限于其叶、花、果实、种子、根或块茎(例如,烟草、玉米、大豆或红花);或在例如家蚕(*Bombix mori*)的蛹中,生产本发明的双互补位纳米抗体和多肽。

[0321] 此外,也可以在没有细胞的表达系统中表达和/或生产本发明的双互补位纳米抗体和多肽,这类细胞的合适的实例对本领域技术人员是显而易见的。一些优选但非限制性的

实例包括在小麦胚芽系统;兔的网织红细胞裂解液;或大肠杆菌Zubay系统中表达。

[0322] 如上所述,使用双互补位多肽和纳米抗体的一个优点是可以通过在合适的细菌系统中表达,来制备基于上述双互补位多肽和纳米抗体的多肽,并且合适的细菌表达系统、载体、宿主细胞、调控元件等对本领域技术人员是显而易见的,例如根据上述参考文献。然而,应该注意到,本发明在最广义的意义上不限于在细菌系统中表达。

[0323] 优选地,在本发明中,使用(体内或体外)表达系统,如细菌表达系统提供处于适合制药用途的形式本发明的多肽,并且这类表达系统对本领域技术人员是显而易见的。也对本领域技术人员显而易见的是,可以使用用于肽合成的技术,制备适合制药用途的本发明的多肽。

[0324] 为了在工业规模生产,用于含双互补位纳米抗体或纳米抗体的蛋白质治疗剂的(工业化)生产的优选的异源宿主包括大肠杆菌、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、酿酒酵母(*S.cerevisiae*)的菌株,所述菌株适合大规模的表达/生产/发酵,特别适合大规模制药(即,GMP级)表达/生产/发酵。此类菌株的合适的实例对本领域技术人员是显而易见的。这类菌株和生产/表达系统也可自公司获得,如Biovitrum(Uppsala,Sweden)。

[0325] 备选地,哺乳动物细胞系,特别是中华仓鼠卵巢(CHO)细胞,可用于大规模的表达/生产/发酵,特别是用于大规模的制药性表达/生产/发酵。再一次地,这类表达/生产系统也可自上文提及的一些公司获得。

[0326] 具体表达系统的选择将部分取决于对某些翻译后修饰,更特别的是糖基化的要求。生产期望或要求糖基化的含纳米抗体的重组蛋白必须使用具有糖基化表达的蛋白的能力的哺乳动物的表达宿主。在这一方面,对本领域技术人员显而易见的是,所获得的糖基化模式(即,附着残基的种类、数量和位置)将取决于用于表达的细胞或细胞系。优选地,使用人细胞或细胞系(即,导致基本具有人糖基化模式的蛋白质),或使用另一种哺乳动物细胞系,所述哺乳动物细胞系可以提供与人糖基化基本上和/或功能上相同的糖基化模式或至少模拟人糖基化。一般而言,原核宿主(如大肠杆菌)不具有糖基化蛋白质的能力,并且使用低等真核细胞(如酵母)通常导致不同于人糖基化的糖基化模式。然而,应该理解,所有的上述宿主细胞和表达系统都可用于本发明,取决于待获得的期望的双互补位纳米抗体或多肽。

[0327] 因此,根据本发明的一个方面,本发明的双互补位纳米抗体或多肽是糖基化的。根据本发明的另一个非限制性的方面,本发明的氨基酸序列、纳米抗体或多肽是非糖基化的。

[0328] 根据本发明的一个优选但非限制性的方面,本发明的双互补位纳米抗体或多肽是细菌细胞中生产的,特别是适合大规模制药生产的细菌细胞,如上述菌株的细胞。

[0329] 根据本发明的另一个优选但非限制性的方面,本发明的双互补位纳米抗体或多肽是在酵母细胞中生产的,特别是适合大规模制药生产的酵母细胞,如上述品种的细胞。

[0330] 根据本发明的另一个优选但非限制的方面,在哺乳动物细胞,特别是人细胞或人细胞系的细胞,更特别是适合大规模制药生产的人细胞或人细胞系的细胞,如上述细胞系中,生产本发明的双互补位纳米抗体或多肽。

[0331] 如WO 08/020079的第138和139页进一步所述,当使用在宿主细胞中表达来生产本发明的双互补位纳米抗体和多肽时,这些抗体或多肽在胞内生产(例如,在胞质溶胶、细胞周质或内涵体中),然后与宿主细胞分离,并任选地进一步纯化;或者可以是在胞外生产(例

如,在培养宿主细胞的培养基中),然后从培养基中分离,并任选地进一步纯化。因此,根据本发明的一个非限制性的方面,本发明的双互补位纳米抗体或多肽是已经在胞内生产并已经从宿主细胞,特别是从细菌细胞,或从细菌细胞的内涵体分离的氨基酸序列、纳米抗体或多肽。根据本发明的另一个非限制性的方面,本发明的双互补位纳米抗体或多肽是已经在胞外生产并已经与培养基分离的纳米抗体或多肽,在所述培养基中培养宿主细胞。

[0332] 这些宿主细胞使用的一些优选但非限制性的启动子包括在WO 08/020079的第139和140页提及的启动子。

[0333] 这些宿主细胞使用的一些优选但非限制性的分泌序列包括在WO 08/020079的第140页提及的分泌序列。

[0334] 适用于转化本发明的宿主或宿主细胞的技术对本领域技术人员是显而易见的,并可取决于待使用的预期宿主细胞/宿主生物和遗传构建体。还参考上述手册和专利申请。

[0335] 在转化后,可以实施检测和选择已用本发明的核苷酸序列/遗传构建体成功转化的宿主细胞或宿主生物的步骤。这可以是例如基于存在于本发明的遗传构建体中的可选择标志物的选择步骤,或涉及使用例如特异性抗体检测本发明的多肽的步骤。

[0336] 经转化的宿主细胞(可以是处于稳定的细胞系的形式)或宿主生物(可以是处于稳定的突变细胞系或菌株的形式)形成本发明的其他方面。

[0337] 优选的,这些宿主细胞或宿主生物表达或(至少)能够表达(例如,在合适的条件下)本发明的双互补位纳米抗体或多肽(并且在宿主生物的情况下:在其至少一个细胞、部分、组织或器官中)。本发明还包括本发明的宿主细胞或宿主生物的其他世代、后代和/或子代,可以是例如通过细胞分裂或有性或无性繁殖获得的。

[0338] 为了生产/获得本发明的氨基酸序列的表达,经转化的宿主细胞或经转化的宿主生物一般可以在这样的条件下保持、维持和/或培养,所述条件允许表达/生产(期望的)本发明的双互补位纳米抗体或多肽。合适的条件对本领域技术人员是显而易见的,并且通常取决于所使用的宿主细胞/宿主生物,以及控制本发明的(相关)核苷酸序列表达的调控元件。再次参考在本发明的遗传构建体的章节中提及的手册和专利申请。

[0339] 一般而言,合适的条件可包括使用合适的培养基;存在合适的食物源和/或合适的营养物;使用合适的温度;和任选地存在合适的诱导因素或化合物(例如,当本发明的核苷酸序列处于可诱导型启动子的控制下);其中都可以由熟练的技术人员选择。再一次地,在这类条件下,本发明的多肽可以以组成型方式、以瞬时的方式或仅在合适诱导时表达。

[0340] 对本领域技术人员仍显而易见的是,本发明的双互补位纳米抗体或多肽可以(首先)以未成熟的形式(如上所述)产生,然后对其进行翻译后修饰,取决于所使用的宿主细胞/宿主生物。本发明的双互补位纳米抗体或多肽也可以是糖基化的,再一次地取决于所使用的宿主细胞/宿主生物。

[0341] 然后,可以使用本身已知的蛋白质分离和/或纯化技术,如(制备性的)层析和/或电泳技术、差异沉淀技术、亲和力技术(例如,使用与本发明的氨基酸序列、纳米抗体或多肽融合的特异性、可切割的氨基酸序列)和/或制备性的免疫学技术(即,使用针对待分离的氨基酸序列的抗体)从宿主细胞/宿主生物中,和/或从培养所述宿主细胞或宿主生物的培养基中,分离本发明的双互补位纳米抗体或多肽。

[0342] 一般而言,对于制药用途,本发明的多肽可以配制成制药制品或组合物,所述制药

制品或组合物包含至少一种本发明的多肽和至少一种可药用的载剂、稀释剂或赋形剂和/或佐剂,和任选地一种或多种其他的制药活性的多肽和/或化合物。作为非限制性的实例,这类制剂可以处于适合口服施用、不经肠道的施用(如通过静脉内、肌肉内或皮下注射,或静脉内灌注)、局部施用、通过吸入(例如,通过喷雾器、计量吸入器(MDI)或干粉吸入器(DPI),或通过经鼻途径)、皮肤贴剂、植入物、栓剂、舌下途径等施用的形式。这类合适的施用形式(可以是固体、半固体或液体,取决于施用的方式),以及用于制备的方法和载体,对本领域技术人员是显而易见的,并进一步描述在本文中。

[0343] 因此,在其他方面,本发明涉及这样的药物组合物,所述药物组合物含有至少一种本发明的双互补位多肽,优选至少一种双互补位免疫球蛋白单可变结构域,和更优选至少一种根据本发明的双互补位纳米抗体,和至少一种合适的载剂、稀释剂或赋形剂(即,适合制药用途的),和任选地一种或多种其他的活性物质。

[0344] 一般而言,可以以本身已知的任何合适的方式,配制和施用本发明的双互补位多肽,参考例如上述一般的背景技术(特别是参考WO 04/041862、WO 04/041863、WO 04/041865、WO 04/041867和WO 08/020079)以及标准手册,如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Company,USA(1990),Remington,the Science and Practice of Pharmacy,第21版,Lippincott Williams and Wilkins(2005);或Handbook of Therapeutic Antibodies(S.Dubel编著),Wiley,Weinheim,2007(参见例如第252-255页)。

[0345] 例如,可以以对于常规抗体和抗体片段(包括ScFv和双体抗体)和其他制药活性的蛋白质本身已知的任何方式,配制和施用本发明的双互补位多肽。此类制剂和用于制备其的方法对本领域技术人员是显而易见的,包括例如适合不经肠道施用(例如,静脉内、腹腔内、皮下、肌肉内、腔内、动脉内或鞘内施用)或局部(即,透皮或皮内)施用。

[0346] 不经肠道施用的制品可以是例如适合灌注或注射的无菌溶液、悬浮液、分散液或乳化剂。用于这类制品的合适的载剂或稀释剂例如包括,但不限于WO 08/020079的第143页提及的那些。通常优选水性溶液或悬浮液。

[0347] 还可以使用递送基因治疗的方法,施用包括双互补位免疫球蛋白单可变结构域和纳米抗体在内的本发明的双互补位多肽。参见例如美国专利号5,399,346,其通过引用全文整合到本文中。利用递送基因治疗的方法,可以额外地用组织特异性启动子转染原代细胞以靶向特定的器官、组织、移植物、肿瘤或细胞,并且还可以用用于亚细胞定位表达的信号和稳定化序列转染所述原代细胞,所述原代细胞转染了编码本发明的双互补位或多肽的基因。

[0348] 因此,可以全身性施用(如口服)本发明的双互补位和多肽、免疫球蛋白单可变结构域和纳米抗体,与可药用的运载体(如惰性稀释剂或可吸收的可食用载剂)组合。它们可以封闭在硬壳或软壳明胶胶囊中,可以压缩成片剂,或者可以与患者的饮食中的食物直接掺合。为了口服的治疗施用,本发明的双互补位多肽可以与一种或多种赋形剂组合,并以处于可摄入的片剂、口腔片、锭剂、胶囊、酏剂、悬浮液、糖浆、薄片等形式使用。这类组合物和制品应该含有至少0.1%的本发明的双互补位多肽、免疫球蛋白单可变结构域或纳米抗体。当然,其在组合物和制品中的百分比可以改变,并方便地在给定单位剂型的约2至约60%的重量之间。在这类治疗有用的组合物中的本发明的双互补位多肽使得可以获得有效的剂量

水平。

[0349] 片剂、锭剂、丸剂、胶囊等也可以含有粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂和甜味剂或芳香剂,例如在WO 08/020079的第143-144页提及的。当单位剂量形式是胶囊时,除上述类型的材料外,可以含有液体载剂,如植物油或聚乙二醇。多种其他材料可以作为包衣存在,或者修饰固体单位剂型的生理形式。例如,可以用明胶、蜡、虫漆或糖等包被片剂、丸剂或胶囊。糖浆或酏剂可以含有本发明的双互补位纳米抗体和多肽、蔗糖或果糖作为甜味剂、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯作为防腐剂、染料和调味剂(如樱桃或桔子风味)。当然,用于制备任何单位剂型的任何材料都应该是可药用的,并且在所应用的量是基本无毒的。此外,可以将本发明的双互补位纳米抗体、免疫球蛋白单可变结构域和多肽掺合到缓释制品和装置中。

[0350] 用于口服施用的制品和配方也可以具有肠溶衣,所述肠溶衣允许本发明的构建体抵抗胃部环境并进入肠。更一般而言,可以恰当地配制用于口服施用的制品和配方,用于递送至胃肠道的任何期望的部分。此外,可以使用合适的栓剂用于递送至胃肠道中。

[0351] 还可以通过灌注或注射静脉内或腹腔内施用本发明的双互补位纳米抗体、免疫球蛋白单可变结构域和多肽,如WO 08/020079的第144和145页进一步所述。

[0352] 对于局部施用,可以以纯的形式,即,当它们是液体时,施用本发明的双互补位纳米抗体、免疫球蛋白单可变结构域和多肽。然而,一般理想的是将其作为组合物或制剂,与皮肤学可接受的载剂组合施用于皮肤,所述载剂可以是固体或液体的,如WO 08/020079的第145页进一步所述。

[0353] 一般而言,本发明的双互补位纳米抗体、免疫球蛋白单可变结构域和多肽在液体组合物(如乳液)中的浓度将是约0.1-25wt-%,优选从约0.5-10wt-%。在半固体或固体组合物(如凝胶或粉末)中的浓度可以是约0.1-5wt-%,优选约0.5-2.5wt-%。

[0354] 用于治疗的本发明的双互补位纳米抗体、免疫球蛋白单可变结构域和多肽的量不仅随所选定的特别的双互补位纳米抗体或多肽而变,还随施用途径、治疗的病况的本质,患者的年龄和状况而变,并最终由主治的医生或临床医生裁定。本发明的双互补位纳米抗体和多肽的剂量也依赖于靶细胞、肿瘤、组织、移植物或器官而改变。

[0355] 期望的剂量可以方便地以单剂量进行,或作为以恰当的时间间隔分开施用的剂量进行,例如,作为每天2、3、4或更多次的亚剂量。亚剂量本身可以进一步细分,例如分为多次离散的宽松间隔的施用;如从吹药器中多次吸入,或向眼内滴入多滴液滴。

[0356] 施用方案可以包括长期的日常治疗。“长期”意指持续至少2周,并优选数周、数月、数年的持续时间。本领域的普通技术人员可以在考虑本文教导内容的条件下,仅用常规实验来确定该剂量范围内的必要修正。参见Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin,E.W.,第4版),Mack Publishing Co.,Easton,PA。在任何并发症的事件中,还可以由个别医生调整剂量。

[0357] 在另一方面,本发明涉及通过施用有效量的根据本发明的多肽或药物组合物,和优选本发明的双互补位免疫球蛋白单可变结构域或纳米抗体,或含有本发明的双互补位免疫球蛋白单可变结构域或纳米抗体的组合物,治疗涉及CXCR2信号转导功能异常的疾病或病况的方法。如本文所讨论的,CXCR2信号转导介导患有导致肺实质破坏的慢性阻塞性肺病(COPD)的患者肺部的炎性响应。在患COPD的患者的肺中可见的数量升高的白细胞的迁移受

这类细胞表面上的CXCR2介导,并且CXCR2结合若干配体,包括IL-8、Gro- α 、 β 、 γ 、EMA 78和GCP-2)。肺中增加的嗜中性粒细胞数与疾病的严重程度相关。此外,在COPD患者的诱导的痰和支气管灌洗(BAL)液中,Gro- α 浓度显著升高。因此,预期CXCR2拮抗作用将预防、治疗或减轻该疾病令人痛苦的症状。

[0358] 因此,本发明涉及预防或治疗COPD或COPD恶化的方法,包括施用双互补位多肽,如本发明的双互补位免疫球蛋白单可变结构域或纳米抗体,和特别地其药物组合物。本发明还涉及所述双互补位多肽,包括双互补位纳米抗体和含有双互补位纳米抗体的组合物用于治疗COPD和COPD恶化的用途。

[0359] 对熟练的读者显而易见的是,本发明的双互补位多肽,特别是双互补位免疫球蛋白单可变结构域或纳米抗体及其药物组合物,也可用于治疗其他疾病,其中涉及CXCR2信号转导功能异常,例如,呼吸道的其他病况,如囊性纤维化、严重哮喘、哮喘恶化、过敏性哮喘、急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征、特发性肺纤维化、气道重构、细支气管炎闭塞综合征或支气管肺发育异常。

[0360] 可以通过本发明的双互补位多肽(例如,双互补位免疫球蛋白单可变结构域或纳米抗体,及其药物组合物)预防或治疗的其他疾病和病况是动脉粥样硬化、肾小球性肾炎、炎性肠病(克氏病)、血管发生和以新血管发育为特征的疾病,包括黄斑退化、糖尿病视网膜病和糖尿病肾病、多发性硬化、银屑病、衰老相关的黄斑退行性疾病、眼部白塞病、葡萄膜炎、包括特发性PAH、家族性PAH和相关的PAH的肺动脉高压(PAH)、慢性炎症性疾病、类风湿性关节炎、骨关节炎、非小细胞癌、结肠癌、胰腺癌、食道癌、卵巢癌、乳腺癌、实体肿瘤和转移、黑素瘤、肝细胞癌或缺血再灌注损伤。

[0361] 可以通过本发明的双互补位多肽(例如,双互补位免疫球蛋白单可变结构域或纳米抗体,及其药物组合物)预防或治疗的其他疾病和病症是镰刀细胞疾病中由溶血性输血诱导的血管闭塞危险、缺血/再灌注损伤、急性中风/心肌梗塞、闭锁性头部损伤、创伤后炎症和胰岛素抗性糖尿病。

[0362] 对于上述方法,可以取决于待使用的特别的制药制剂或组合物,以任何合适的方式,施用本发明的双互补位纳米抗体、免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽,和/或包含本发明的双互补位纳米抗体、免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽的组合物。因此,再次取决于待使用的特别的制药制剂或组合物,可以例如口服、腹膜内(例如静脉内、皮下、肌肉内,或通过任何其他规避胃肠道的施用途径)、鼻内、透皮、局部、通过栓剂的方式、吸入,来施用本发明的双互补位纳米抗体和/或多肽,和/或包含本发明的双互补位纳米抗体和/或多肽的组合物。对于COPD,一般而言吸入不是优选的途径。临床医生能够根据个体患者的需要,选择合适的施用途径,和用于这类施用中的合适的制药制剂或组合物。

[0363] 根据适合预防和/或治疗待预防或治疗的疾病或病症的治疗方案,施用本发明的双互补位纳米抗体、免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽,和/或包含本发明的双互补位纳米抗体、免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽的组合物。取决于因素如待预防或治疗的疾病或病症,待治疗的疾病的严重程度,和/或其症状的严重程度、临床医生一般能够确定合适的治疗方案,待使用的本发明的特别的双互补位纳米抗体、免疫球蛋白单可变结构域或多肽、待使用的特别的施用途径,和制药制剂或组合物、患者的年龄、性别、体重、饮食、总体状况,和临床医生普遍已知的类似因素。

[0364] 一般而言,为了预防和/或治疗本文提及的疾病和病症,特别是COPD,待施用量取决于待使用的本发明的特别的双互补位纳米抗体、免疫球蛋白单可变结构域或多肽的效力、使用的特别的施用途和特别的制药制剂或组合物。一般而言,施用量在1克和0.01微克/kg体重/天之间,优选在0.1克和0.1微克/kg体重/天之间,如约1、10、100或1000微克/kg体重/天,作为连续的(例如,灌注)单次每日剂量或一天中多次分开的剂量。临床医生一般能够根据本文提及的因素,确定合适的每日剂量。还显而易见的是,在特别情况下,例如基于上述因素和他的专业判断,临床医生可以选择不按照这些量。

[0365] 本发明的双互补位纳米抗体、免疫球蛋白单可变结构域和多肽还可以与一种或多种其他的治疗活性化合物或原则组合使用,即,作为组合的治疗方案,其可以产生或不产生协同效应。再一次地,临床医生能够基于上述因素及其专业的判断,选择这类其他的化合物或原则,以及合适的组合治疗方案。

[0366] 例如,可以组合本发明的双互补位多肽,如双互补位纳米抗体,与COPD的常规治疗,如短效和长效 β -肾上腺素能支气管扩张剂、吸入式抗胆碱能药物(毒蕈硷型拮抗剂)和吸入式皮质类固醇。

[0367] 可以按任何本身已知的方式,确定和/或跟踪根据本发明使用的治疗方案对所涉及疾病或病症的效果,这对临床医生是显而易见的。在恰当时并基于个案基础,临床医生还能够改变或修饰特定的治疗方案,从而实现期望的疗效,避免、限制或降低不想要的副作用,和/或在实现理想的疗效的一方面与避免、限制或降低不想要的副作用的另一面之间实现恰当的平衡。

[0368] 一般而言,遵循治疗方案,直到实现期望的治疗效果和/或只要维持了期望的治疗效果。再一次地,这可以由临床医生决定。

[0369] 待治疗的对象可以是任何暖血动物,但特别是哺乳动物,更特别是人。对本领域技术人员显而易见的是,待治疗的对象尤其是患有本文提及的疾病和病症,或处于本文提及的疾病和病症的风险的人。

[0370] 通过下列非限制性的优选方面、实施例和附图进一步描述本发明。

[0371] 本文提及的所有出版物通过引用整合到本文中。

[0372] 1.人和食蟹猴CXCR2克隆

[0373] 表1

[0374]

人 CXCR2 SEQ ID NO. 1	MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSSTLPPFLDAAPCEPESLEINKYFVWIIYALV FLLSLLGNSLVMLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPWAASKVNGWIFGTFL CKVVSLLKEVNFYSGILLACISVDRYLAIVHATR TLTQKRYLVKFICLSIWGLSLLLALP VLLFRRTVYSSNVSPACYEDMGNNNTANWRMLLRILPQSFGFIVPLLMFCYGFTLRT L FKAHMGQKHRAMRVIFAVVLIFLLCWLPYNLVLLADTL MRTQVIQETCERRNHIDRA LDATEILGILHSCLNPLIYAFIGQKFRHGLLKILAIHGLISKDSL PKDSRPSFVGSSSGHT STTL
人 Δ 1-17 CXCR2 SEQ ID NO. 2	MEDLSNYSYSSTLPPFLDAAPCEPESLEINKYFVWIIYALV FLLSLLGNSLVMLVILYS RVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPWAASKVNGWIFGTFLCKVVSLLKEVNFYSGIL LLACISVDRYLAIVHATR TLTQKRYLVKFICLSIWGLSLLLALPVLLFRRTVYSSNVSPA CYEDMGNNNTANWRMLLRILPQSFGFIVPLLMFCYGFTLRTL FKAHMGQKHRAMRV IFAVVLIFLLCWLPYNLVLLADTL MRTQVIQETCERRNHIDRALDATEILGILHSCLNPLI YAFIGQKFRHGLLKILAIHGLISKDSL PKDSRPSFVGSSSGHTSTTL
食蟹猴 CXCR2 SEQ ID NO. 3	MQSFNFEDFWENEDFSNYSYSSDLPPSLPDVAPCRPESLEINKYFVWIIYALV FLLSLL GNSLVMLVILHSRVGRSITDVYLLNLAMADLLFALTLPWAAAKVNGWIFGTFLCKVVS LLKEVNFYSGILLACISVDRYLAIVHATR TLTQKRYLVKFVCLSIWLSLLLALPVLLFR RTVYLTYSPPVCYEDMGNNNTAKWRMVLRLPQTGFILPLLIMFCYGFTLRTL FKAHM GQKHRAMRVIFAVVLIFLLCWLPYHLVLLADTL MRTRLINETCQRRNNIDQALDATEIL GILHSCLNPLIYAFIGQKFRHGLLKILATHGLISKDSL PKDSRPSFVGSSSGHTSTTL

[0375] pcDNA3.1 (+) (Invitrogen, V790-20) 设计用于在多种哺乳动物细胞系中高水平的组成型表达。它含有人巨细胞病毒立即早期启动子、牛生长激素 (BGH) 多聚腺苷酸信号、用于哺乳动物细胞的新霉素选择标志物, 和用于在E. Coli中选择的青霉素抗性基因。

[0376] pVAX1 (Invitrogen, V260-20) 是设计用于DNA疫苗的质粒载体。它含有人巨细胞病毒立即早期启动子、牛生长激素 (BGH) 多聚腺苷酸信号, 和用于在E. Coli中选择的卡那霉素抗性基因。

[0377] 表2

[0378] 构建体:

[0379]

受体	载体	构建体
人 CXCR2 (N 末端 3xHA-标签)	pcDNA4/TO	在 pcDNA4/TO 中, 分别在 5'和 3'端的 HindIII 和 XhoI 限制性酶切位点之间, 亚克隆 DNA 序列, 所述 DNA 序列编码后接 hu CXCR2 序列的 3 个 HA 标签
人 N 末端 CCR9 嵌合 CXCR2 (N 末端 3xHA-标签)	pcDNA4/TO	在 pcDNA4/TO 中, 分别在 5'和 3'端的 HindIII 和 XhoI 限制性酶切位点之间, 亚克隆 DNA 序列, 所述 DNA 序列编码 3 个 HA 标签, 后接 hu CCR9 的前 39 个氨基酸、TEV 蛋白酶位点和减去 N 末端 43 个氨基酸的 hu CXCR2 序列
人 Δ 1-17 CXCR2 (N 末端 3xHA-标签)	pcDNA4/TO	在 pcDNA4/TO 中, 分别在 5'和 3'端的 HindIII 和 XhoI 限制性酶切位点之间, 亚克隆 DNA 序列, 所述 DNA 序列编码 3 个 HA 标签, 后接缺少 N 末端 17 个氨基酸的 hu CXCR2 序列
人 CXCR2	pXoon	使用含有 <i>EcoR</i> I 切割位点的 5'引物和含有 <i>Not</i> I 位点的 3'引物, PCR 扩增人 CXCR2 (_h CXCR2) cDNA (GENBANK: L19593)。将 PCR 产物连接到 pXOON 质粒载体中
食蟹猴 CXCR2	pcDNA3.1	从脾/胸腺食蟹猴 cDNA 文库中扩增食蟹猴 CXCR2 cDNA。通过 PCR 添加 <i>Not</i> I 和 <i>Xho</i> I 限制性酶位点, 将获得的片段克隆到 pcDNA3.1 中
人 CXCR2	pVAX1	在 pXoon_hCXCR2 上 PCR (<i>Nhe</i> I- <i>Not</i> I)
食蟹猴 CXCR2	pVAX1	来自 pcDNA3.1_cCXCR2 的 <i>Nhe</i> I- <i>Xho</i> I
人 Δ 1-17 CXCR2	pVAX1	pcDNA3.1_3xHA- Δ 1-17-hCXCR2 上的 PCR (<i>Hind</i> III- <i>Xho</i> I)
人 Δ 1-17 CXCR2 (N 末端 3xHA-标签)	pcDNA3.1	来自 pCR4Blunt-TOPO_3xHA- Δ 1-17-hCXCR2 的 <i>Hind</i> III- <i>Xho</i> I

[0380]

人 CXCR2	pcDNA3.1	来自 pVAX1_hCXCR2 的 NheI-XhoI
---------	----------	-----------------------------

[0381] 2. 建立表达人和食蟹猴CXCR2的CHO、CaKi、RBL和HEK293T细胞系

[0382] 表3

[0383] 细胞系

[0384]

宿主	转化	受体	载体
CHO	稳定	人 Δ 1-17 CXCR2 (N 末端 3xHA-标签)	pcDNA3.1
HEK293T	瞬时	食蟹猴 CXCR2	pcDNA3.1
添加的 Caki info'			
/	DNA 免疫	人 CXCR2	pVAX1
/	DNA 免疫	食蟹猴 CXCR2	pVAX1
/	DNA 免疫	人 Δ 1-17 CXCR2	pVAX1
RBL	稳定	人 CXCR2 cDNA	pSFFV-Neo
RBL -2H3	稳定	食蟹猴 CXCR2 cDNA	pcDNA3.1
CHO-Trex	稳定	(HA)3-huCXCR2	pcDNA4/TO
CHO-Trex	稳定	(HA)3-huCCR9-huCXCR2	pcDNA4/TO
CHO-Trex	稳定	(HA)3-huCXCR2 Δ N1-17	pcDNA4/TO
L2071	稳定	人 CXCR1	pSFFV neo
CEM	内源性	CXCR4	-

[0385] CHO-K1 Δ 1-17人CXCR2 (N末端3xHA标签)

[0386] 使用Amaxa电穿孔体系(T溶液中程序U 23),用质粒pcDNA3.1_3xHA- Δ 1-17-hCXCR2转染CHO-K1细胞。从转染后第2天,将经转染的细胞池保持在选择压力(1000 μ g/mL G418)下。8天后,使用FMAT Blue-标记的人GRO- α ,鉴别人CXCR2阳性群体。人Gro- α 的FMAT Blue标记(Biosource,PHC1063)是使用FMAT Blue单功能反应性染料试剂盒,根据生产商的说明(Applied Biosystems,4328408)进行的。使用FACSaria(BD Biosciences)将单细胞分选到96孔细胞培养板中。在FACS阵列(BD Biosciences)装置上,使用FMAT Blue-标记的人GRO- α ,测试生长的克隆的 Δ 1-17人CXCR2表达。选择具有最高表达的CHO-K1克隆(MCF值9000)。

[0387] HEK293T食蟹猴CXCR2

[0388] 使用FuGene HD转染试剂(Roche),用质粒pcDNA3.1_cCXCR2转染HEK293T细胞。转染2天后,使用50nM FMAT Blue标记的GRO- α ,在FACS阵列(BD Biosciences)装置上测试细胞的cCXCR2表达。进一步使用具有良好表达的细胞(MCF值约12000)。

[0389] RBL-2H3食蟹猴CXCR2

[0390] 将大鼠嗜碱性粒细胞白血病细胞 (RBL-2H3) 生长在37℃/5%CO₂下,并在补充了1X非必需氨基酸、0.15%碳酸氢钠、1mM丙酮酸钠和15%胎牛血清 (Invitrogen) 的MEM Eagle培养基 (Invitrogen) 中常规传代培养,根据生产商的规程,对其进行电穿孔核转染 (Amaxa Biosystems)。在37℃/5%CO₂中孵育转染的细胞,并通过添加至终浓度1mg/mL的遗传霉素,启动转染后24小时抗生素选择。在通过系列稀释进行单细胞分选至96孔板中之前,在选择培养基中生长和传代转染的细胞3-5天。在约2周后,扩大活跃生长的克隆,并之后分析cynoCXCR2转录本表达。然后,进一步扩大阳性克隆进行分析。

[0391] CHO-Trex (HA) 3-huCXCR2和 (HA) 3huCCR9-CXCR2杂合体

[0392] 在含有补充了10%不含四环素的胎牛血清 (FBS) (Biosera)、1%青霉素/链霉素&10μg/mL杀稻瘟菌素的2mM L-谷氨酰胺的Ham F12培养基中,在37℃作为单层培养物维持中华仓鼠卵巢T-Rex (T-RexTM-CHO, Invitrogen, #R718-07)。这一受四环素调控的表达 (T-RexTM) 细胞系稳定表达四环素抑制剂 (TetR)。然后,使用核转染方法 (Cell Line Nucleofector Kit T, Amaxa Biosystem, 程序U-23), 生产表达两种CXCR2构建体的稳定细胞系。在37℃/5%CO₂中孵育转染的细胞,并在转染后48小时,用300μg/mL博莱霉素处理。在存在博莱霉素的条件下培养细胞数周,以允许选择阳性转化体,之后使用Mo-Flo FACS分选仪进行单细胞分选。2周后,扩大活跃生长的克隆,同时维持在博莱霉素浓度300μg/mL的常规培养基中。

[0393] 3. 人GROα、食蟹猴Gro-a、人IL-8、人ENA-78

[0394] 表4

[0395] NVTs-IL-8、ENA-78、食蟹猴Gro-a

[0396]

配体	评述	来源
人GROα	重组	Biosource (PHC1063)
人IL-8	重组	Novartis Vienna
人ENA-78	重组	Peptrotech ltd (300-22)
Cyno GROα	重组	ALMAC Sciences

[0397] 4. 肽

[0398] 代表人和食蟹猴CXCR2的不同N末端和胞外环 (EL) 的一段序列的肽购自Bachem (表5)。在标为“环状”的肽中,第一个和最后一个氨基酸被半胱氨酸残基取代,而野生型序列的天然存在的内部半胱氨酸被亮氨酸残基取代。这些肽是通过侧翼的半胱氨酸残基环化的。

[0399] 表5

[0400]

名称	序列	修饰
食蟹猴 1 至 14	MQSFNFEDFWENED SEQ ID NO. 4	C 末端缀合生物素
食蟹猴 EL3 环状	CTLMRTRLINETLQRRNC SEQ ID NO. 5	N 末端缀合生物素 或 KLH
食蟹猴 EL2 环状	CRRTVYLTYISPVLYEDMGN	N 末端缀合生物素

[0401]

	NTALWC SEQ ID NO. 6	或 KLH
人 1 至 19	MEDFNMESDSFEDFWKGED SEQ ID NO. 7	C 末端缀合生物素
人 18 至 48	EDLSNYSYSSTLPPFLLDAAP CEPESLEINK SEQ ID NO. 8	C 末端缀合生物素
人 EL2	FRRTVYSSNVSPACYEDMGN NTANWR SEQ ID NO.9	N 末端缀合生物素 或 KLH
人 EL2 环状	CRRTVYSSNVSPALYEDMG NNTANWC SEQ ID NO. 10	N 末端缀合生物素 或 KLH
人 EL3	DTLMRTQVIQETCERRNH SEQ ID NO. 11	N 末端缀合生物素 或 KLH
人 EL3 环状	CTLMRTQVIQETLERRNC SEQ ID NO.12	N 末端缀合生物素 或 KLH

[0402] 5. 免疫

[0403] 用表达人CXCR2的哺乳动物细胞免疫3只美洲驼7-9次,并用表达食蟹猴CXCR2的哺乳动物细胞免疫1只美洲驼6次。在该方案后施用4次与(不)完全弗氏佐剂混合的肽-钥孔虫血蓝蛋白(KLH)缀合物混合物,肽代表人和食蟹猴CXCR2的胞外环编号2和3(参见表5)。用从

pVAX1表达的编码人全长CXCR2或 $\Delta 1-17$ CXCR2的DNA免疫另外8只美洲驼4-5次,随后施用1次表达人全长CXCR2的哺乳动物细胞。用从pVAX1表达的编码食蟹猴CXCR2的DNA免疫额外3只美洲驼4次,随后施用1次表达食蟹猴CXCR2的哺乳动物细胞。在施用每种抗原4天和8天后,采集免疫血样和淋巴结样品。

[0404] 6. 文库构建体

[0405] 从免疫血样和淋巴结样品的总RNA制品制备cDNA样品。在使用引物ABL051、ABL052和ABL003的一步RT-PCR反应中,从所有用人或食蟹猴CXCR2免疫的美洲驼的cDNA样品中,扩增编码纳米抗体的核苷酸序列。引物序列显示在表6中。将从样品中的IgG2和IgG3cDNA扩增的700bp扩增子与凝胶分离,并之后用作巢式PCR反应的模板,所述巢式PCR反应使用含有SfiI限制性酶切位点的ABL050引物和ABL003引物。之后,用SfiI和BstEII消化PCR产物(天然存在于VHH基因的FR4中),并连接到噬菌粒载体pAX50的相应的限制性酶位点中,以在电穿孔大肠杆菌TG-1后获得文库。pAX50是源自pUC119的表达载体,含有LacZ启动子、大肠杆菌噬菌体pIII蛋白质编码序列、氨苄青霉素或羧苄青霉素的抗性基因、多克隆位点和gen3前导序列。在Nanobody®编码序列的框内,载体编码C末端c-myc标签和(His)6标签。噬菌粒载体允许生产噬菌体颗粒,将单个纳米抗体表达为与geneIII产物的融合蛋白。

[0406] 表6-引物序列

[0407]

ABL051	GGCTGAGCTGGGTGGTCCTGG	SEQ ID NO. 13
ABL052	GGCTGAGTTTGGTGGTCCTGG	SEQ ID NO. 14
ABL003	GGTACGTGCTGTTGAAGTGTTC	SEQ ID NO. 15
ABL050	CATTGAGTTGGCCTAGCCGGCCATGGCAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGG	SEQ ID NO. 16
M13Fwd	TGTAAACGACGGCCAGT	SEQ ID NO. 17
M13Rev	CAGGAAACAGCTATGACC	SEQ ID NO. 18
Rev_30GlySer	TCAGTAACCTGGATCCCCCGCCACCGCTGCCTCCACCGCCGCTACCCCGCCACCGCTGCCTCCACCGCCTGAGGAGACGGTGACCTG	SEQ ID NO. 19
For_GlySer35	AGGTTACTGAGGATCCGGCGGTGGAGGCAGCGAGGTGGGGGCTCTGGTGGCGG 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	ACCGCTCCGGAGGAGACCGTGACCTGGGTCCC	SEQ ID NO. 24

[0408] 7. 选择

[0409] 使用呈递CXCR2表位的肽、膜提取物和全细胞选择在噬菌体表面上表达的上述pAX50纳米抗体文库。

[0410] 使用肽的选择包含孵育neutravidine包被的(Pierce,31000)Maxisorp微滴度板(Nunc,430341)上捕获的0-1000nM生物素化的肽上的噬菌体文库(见表5)。备选地,在具有10nM生物素化的肽的溶液中孵育噬菌体文库,随后在链霉亲和素包被的Dynabeads

(Invitrogen, 112-06D) 上捕获肽-噬菌体复合物。使用补充了1%酪蛋白的PBS实施封闭。添加从文库制备的噬菌体,并孵育1小时(在补充了0.1%酪蛋白和0.1% tween20的PBS中)。洗去未结合的噬菌体(用补充了0.05% tween20的PBS);通过添加胰蛋白酶(在PBS中1mg/ml) 15min,洗脱结合的噬菌体。第二轮选择基本如前所述实施。

[0411] 通过用从表达人CXCR2的细胞(Perkin Elmer, ES-145-M400UA和6110524400UA)制备的50ug/mL(总蛋白)膜提取物包被免疫试管(Nunc, 444474),实施使用膜提取物的选择。作为阴性对照,平行地包被从表达人FPR1的CHO细胞(Perkin Elmer, 6110527400UA)制备的膜提取物。使用补充了4%Marvel脱脂奶粉的PBS实施封闭。孵育噬菌体2小时(在补充了1% Marvel的PBS中)。用PBS洗去未结合的噬菌体;通过添加胰蛋白酶(在PBS中1mg/ml) 15min,洗脱结合的噬菌体。基本如上所述实施第二轮选择。在一些情况下,通过在用对照膜提取物包被的连续的管或孔中预先吸收噬菌体,特异性地耗尽与不相关的细胞背景表位结合的噬菌体。之后,在溶液中存在对照膜提取物的条件下,在经包被的人CXCR2膜提取物上实施孵育。在其他实验中,在一至两轮对肽的选择后,进行一轮对膜提取物的选择,反之亦然。

[0412] 在另一组实验中,在补充了10%FBS和1%Marvel脱脂奶粉的PBS中,用噬菌体文库孵育1至5百万个表达人或食蟹猴CXCR2的哺乳动物细胞。使用未转化的细胞系作为阴性对照。用PBS洗去未结合的噬菌体;加入胰蛋白酶(在PBS中1mg/ml) 15min,洗脱结合的噬菌体。基本如上所述实施第二轮,但使用不同于第一轮 of 细胞系背景。

[0413] 在其他实验中,在溶液中存在1μM肽(参见表5)的条件下,用表达CXCR2的膜提取物或哺乳动物细胞孵育噬菌体,以耗尽表达与这些肽所示区域结合的纳米抗体的噬菌体。

[0414] 8. 制备细胞周质提取物

[0415] 允许经洗脱的噬菌体感染指数生长的TG-1细胞,然后将所述细胞接种在含有羧苄青霉素的LB琼脂平板上。分析羧苄青霉素抗性克隆中存在插入片段,并验证阳性克隆的序列。目标克隆在补充了羧苄青霉素的TB培养基中生长,并通过添加IPTG诱导进行表达。使表达在37℃持续4小时,随后旋转沉降细胞。将来自大肠杆菌表达培养物的过夜冰冻的细胞沉淀溶解在PBS中(初始培养体积的1/10),并在温和振荡的条件下,于4℃孵育1小时。然后,再将细胞旋转沉降一次,并储藏含有分泌到周质空间中的蛋白质的上清液。

[0416] 9. 筛选

[0417] 在FACS上分析细胞周质提取物(如上所述)与Gro-α竞争结合人CXCR2。将 2×10^5 细胞与在FACS缓冲液中1/2稀释的细胞周质提取物(PBS+10%胎牛血清(Sigma, F7524)),在4℃孵育30分钟。然后,添加等体积的在FACS缓冲液中的6nM FMAT Blue-标记的人Gro-α,并在黑暗在4℃再继续孵育30分钟。然后,在FACS缓冲液中洗涤细胞3次,最后重悬在FACS缓冲液中。用碘化丙啶(Sigma, P4170)对死亡的细胞进行染色。然后,在FACS阵列(BD Biosciences)上分析样品。表7列举了细胞周质提取物表现出与Gro-α竞争人CXCR2的纳米抗体。

[0418] 表7-Gro-α竞争人CXCR2(细胞周质提取物)

[0419]

名称	FACS Gro-α竞争(%抑制)
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

[0420]

名称	FACS Gro- α 竞争(%抑制)
147A1	58.3
146A6	42.7
145C9	53.5
163D2	86.8
163E3	80.1
2B2	38.1
空白对照	0.4

[0421] 在另一种设置中,通过ELISA分析周质提取物与人1-19肽的结合。用neutravidin包被MaxiSorb平板(Nunc,430341)2小时,随后封闭1小时(PBS,1%酪蛋白)。然后,对这些平板添加100nM生物素化的人1至19肽1小时(PBS,0.1%酪蛋白,0.05% tween20),随后用细胞周质提取物的10倍稀释物孵育1小时。洗去未结合的细胞周质提取物(补充了0.05% tween20的PBS),并使用小鼠抗myc(Roche,11667149001),随后使用兔抗小鼠-HRP缀合物(Dakocytomation,P0260),检测结合的纳米抗体。表8总结了抗CXCR2纳米抗体与不相关的对照纳米抗体的结合信号比例。

[0422] 表8-结合周质提取物的人CXCR21至19肽

[0423]

名称	1-19 Nter 肽 ELISA (相对于空白对照的结合信号比例)
54B12	75.5
53E7	13.3
97A9	0.8
127D1	39.5

[0424]

名称	1-19 Nter 肽 ELISA (相对于空白对照的结合信号比例)
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

[0425] 10. 序列

[0426] 表9-单价抗CXCR2纳米抗体的序列

[0427] 表9

[0428]

143B03	SEQ ID NO. 25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYWMYWRQAPGKGLDWVSAINAGGDSITYADPVKGRFTISRDNKNNTLYLQMNSLKPEDTALYYCATVRGTARDLDYWGQGTQVTVSS
139D05	SEQ ID NO. 26	EVKLVESGGGLVQAGGSLRLSCALSGRIGSINAMGWYRQVSGQQR ELVAVSRSGGSTDIADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCYAHTSSYSNWRVYNNDYWGQGTQVTVSS
146A06	SEQ ID NO. 27	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLTCAASGRIGTINAMGWYRQAPGKQR ELVAVITSGGRIDYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYNVETVVGAVYWGQGTQVTVSS
147A01	SEQ ID NO. 28	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRMGNNINAMGWYRQAPGKER ELVAKITRGGAITYADSVKGRFTIARDNINLTAYLQMNNDLKPEDTAVYYNVdGGPSQNYWGQGTQVTVSS
145C09	SEQ ID NO. 29	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQAPGKERE RVSCISGSDGSTYYADSVKGRFTISSDNKNTVYLQMNNDLKPEDTAVYYCAAYWGLTLRLWMPPHRYDYWGQGTQVTVSS
145D03	SEQ ID NO. 30	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLIFRLSGMAWYRQAPGRQR EWVAVLTkdGTLHYADPVKGRFTISRNNaENTWYLQMNNSLKPEDTALYYCNTGRYWGQGTQVTVSS
144D01	SEQ ID NO. 31	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGTIGTIRAMGWYRQAPGKQRE LVALITSTGRINYADSVKGRFTIGRDNAKNTAYLQMNNDLKPEDTAVYYNIETLRRNYWGQGTQVTVSS
139H02	SEQ ID NO. 32	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFSNYAMGWFRQATGKEREFAAI NKSGGNTHYAGSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNNSLKPEDTAVYYCAASRTNPKPDYWGQGTQVTVSS
139A08	SEQ ID NO. 33	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFSRSAMCWLRQAPGKEREFAVAG ISWGGDNSYYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMNNSLKPEDTAVYYCAARYRGGAAVAGWEYWGQGTQVTVSS
137A08	SEQ ID NO. 34	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTLAYTVGWFRAPGKEREISGIS SSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNNSLKPEDTAVYYCAADRRTDCKKGRVGSWSWGQGTQVTVSS
143A05	SEQ ID NO. 35	KVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFNYYVMWFRQAPGKEREFAAI STRGSMTKYSDSVQGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKPEDTAVYYCAADPRGSSWSFSSGGYDYWGQGTQVTVSS
137B07	SEQ ID NO. 36	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGIIFRLSALGWTRQPGKAREWVAGI NSDGTNYADPVKGRFTISRDNKNTIYHMDMLKPEDTAVYYCASGKYRGQGTQVTVSS
127D01	SEQ ID NO. 37	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFDFKVMGWYRQPPGKQREGVAA IRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNNSLKPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQVTVSS
126B11	SEQ ID NO. 38	EVQLVESGGGLVQAGGSLTSCAVSGSSFRINTMGWYRRAPGKQRELVAAR DRGGYINYVDSVKGRFTVSRDNKPTMYLQMNNSLKPEDTAVYYCHAGTQDR TGRNFDHWGQGTQVTVSS
097A09	SEQ ID NO. 39	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQRELVAADIT SGGNINYIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNNSLKPEDTAVYYCNAEIVLVGV WTQRARTGNYWGQGTQVTVSS
159B10	SEQ ID NO. 40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSSLSMGWFRQAPGKERAFVAA LTRNGGYRYADSVKGRFTISRDAKKTLYLQMNNSLKPEDTAVYYCAADSLSGSDYLGTNLDYWGQGTQVTVSS
163D02	SEQ ID NO. 41	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSDYAMGWFRQAPGKEREFAAI TWNGGRVFTASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNNSLKPEDTAVYYCAADKDR RTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSS
163E03	SEQ ID NO. 42	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFAAI TWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQMNNSLKPEDTAVYYCAAGGS SWLSFPDPYWGQGTQVTVSS
2B2	SEQ ID NO. 43	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSIL TINAMGWYRQAPGKQRELVVRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNNSLKPEDTAVYYCMLDDRGGV YWGQGTQVTVSS
54B12	SEQ ID NO. 90	EVQLVESGGGLVQAGGSLTSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQRELVAAR DRGGYINYVDSVKGRFTVSRDNKPTMYLQMNNSLKPEDTAVYYCHAGTQDR TGRNFDRWGQGTQVTVSS

[0429] 单价纳米抗体的主要表征

[0430] 11. 构建单价纳米抗体

[0431] 用MfeI和BstEII消化含有纳米抗体的DNA片段,并将所述DNA片段连接到pAX100载体中,并转化进入大肠杆菌TG-1感受态细胞中,所述DNA片段是通过使用Fwd-EVQL-MfeI和Rev-TVSS-BstEII引物(表1)PCR功能性噬菌粒克隆获得的。pAX100是源自pUC119的表达载体,其含有LacZ启动子、卡那霉素抗性基因、多克隆位点和OmpA前导序列。在纳米抗体编码序列框内,载体编码C末端c-myc标签和His6标签。分析卡那霉素抗性克隆中存在插入片段,并验证阳性克隆的序列。

[0432] 12. 小规模表达

[0433] 在带挡板的摇瓶中生长含有编码目标纳米抗体的表达载体的TG-1细胞,摇瓶中含有添加了100 μ g/ml卡那霉素的TB培养基,并通过添加1mMIPTG诱导表达。在37 $^{\circ}$ C继续表达4小时。在收集细胞后,制备周质提取物,并通过固定化的金属亲和层析纯化His6-标记的纳米抗体(HisTrap FF Crude, GE Healthcare),随后在PBS中脱盐(HiPrep 26/10, GE Healthcare)或凝胶过滤层析(Superdex 75HR16/10, GE Healthcare)。

13. 配体竞争测定

[0434] 在人和食蟹猴CXCR2的FACS配体竞争测定中,用3nMFMAT-Blue-标记的Gro- α 滴定纯化的单价抗CXCR2纳米抗体(表10)。对于人CXCR2,封闭效价的范围在两位数nM和次-nM之间,而对于食蟹猴CXCR2,其范围在一位至两位数nM之间。

[0435] 表10-单价抗CXCR2纳米抗体的配体竞争效价

	人 CXCR2		食蟹猴 CXCR2	
	IC50 (M)	最大%抑制	IC50 (M)	最大%抑制
[0436]	137B7	1.11E-09	93.5	NA
	163D2	6.95E-09	96.4	1.48E-08
	127D1	3.09E-10	61.1	4.41E-09
	97A9	1.72E-08	93.9	6.41E-08
	163E3	8.96E-09	92.4	1.48E-08
	54B12	8.57E-10	35.0	3.95E-08
	2B2	2.07E-09	42.7	3.16E-08

[0437] NA: 不能测量到活性

[0438] 14. 使用重组细胞系的功能测定

[0439] (1) 测量激动剂诱导的胞内钙释放 (FLIPR)

[0440] 将表达人或食蟹猴CXCR2受体的RBL细胞接种在96孔板中,并在37 $^{\circ}$ C孵育过夜。在实验当天,于37 $^{\circ}$ C用Fluo-4染料装载细胞30min,随后用纯化的单价抗CXCR2纳米抗体孵育30分钟。最后,使用荧光成像平板阅读器(FLIPR),添加GR0- α ,随后检测与胞内钙释放对应的荧光信号。使用表达人CXCR1的L2071细胞实施选择性测定。测定规程与关于CXCR2所述仍然是相同的,但使用IL-8作为激动剂。表11中显示了对平均IC₅₀值的概括。此外,在测试浓度

(1 μ M最大浓度)下,测试的纳米抗体无一显示出对激动剂诱导的胞内钙释放的任何抑制作用。

[0441] (2) 测量激动剂刺激的 $[^{35}\text{S}]\text{GTP } \gamma \text{ S}$ 积累

[0442] 在96孔板中,用GRO- α 、GDP、SPA珠和从表达人CXCR2受体的CHO细胞制备的CHO-CXC2膜,孵育纯化的单价抗CXCR2纳米抗体60分钟。随后添加 $[^{35}\text{S}]\text{GTP } \gamma \text{ S}$,再孵育60分钟。最后,先于在Topcount上读数前,离心平板。表11中显示了对平均IC₅₀值的概括。

[0443] 表11-在使用重组细胞系的功能性测定中,纯化的单价抗CXCR2 **Nanobodies**[®]的IC₅₀值

	FLIPR				$[^{35}\text{S}]\text{GTP } \gamma \text{ S}$	
	人 CXCR2		食蟹猴 CXCR2		人 CXCR2	
	IC ₅₀ (M)	% 最大抑制	IC ₅₀ (M)	%最大抑制	IC ₅₀ (M)	%最大抑制
[0444] 137B7	6.71E-9	100	NA	-	ND	-
163D2	1.91E-9	100	3.72E-8	100	5.32E-8	100
127D1	2.19E-8	100	7.53E-7	100*	1.25E-8	66.0
97A9	3.99E-8	100	6.40E-7	100	5.03E-8	100
163E3	4.43E-8	100	1.58E-7	100	6.47E-8	100
54B12	1.53E-7	100	4.08E-6	100*	1.54E-8	71.8
2B2	4.41e-7	100	3.85E-6	100*	1.03E-7	71.3

[0445] *在测试浓度下,曲线固定为100%抑制,因为没有获得平台。NA-不能测量到任何活性。ND-未确定。

[0446] 15. 使用原代嗜中性粒细胞的功能测定

[0447] (1) 人嗜中性粒细胞全血形状改变测定 (hWBSC)

[0448] 供体是没有全身用药的健康正常志愿者 (Novartis Horsham供体组)。收集用52mM EDTA(无菌)抗凝的全血,比例为1mL EDTA比9mL血液。在室温收集血液,并在使用前预热。在用趋化因子刺激前,用CXCR2纳米抗体于室温预孵育80 μ L全血10min(每个剂量应答10个点(0.03-1.144x 10⁻⁷ μ M);除了0化合物外,向所有的孔添加10 μ L rhGRO α (2nM近似EC₇₀浓度),向所述0化合物添加10 μ L形状改变测定缓冲液。温和振荡样品,在37 $^{\circ}$ C再孵育5分钟。然后,将管放置在冰上,并添加250 μ L冰冷的优化的CellFixTM溶液,温和振荡试管,并再孵育5分钟,然后向所有的试管中加入1.4mL的1X氯化铵裂解溶液,并再放置冰上20分钟。在红细胞裂解后,在FACSCalibur流式细胞仪 (Becton Dickinson) 上分析样品。通过前向散射/侧向散射 (FSC/SSC) 设门,随后通过使用第一图的经设门的粒细胞的FSC/FL-2图鉴别细胞群体。在FL-2图上区分嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞,因为后者具有较高的自身荧光。每个样品计数5000个事件。

[0449] (2) 人嗜中性粒细胞趋化性测定

[0450] 供体是没有全身用药的健康正常志愿者 (Novartis Horsham 供体组)。收集用 52mM EDTA (无菌) 抗凝的全血, 比例为 1mL EDTA 比 9mL 血液。使用标准规程分离白细胞: 向 20mL 抗凝的血液中加入 4% 右旋糖, 温和混合后, 在冰上孵育 30min, 以允许红血细胞沉淀。然后, 将含有外周血单核细胞 (PMN) 的上清液平铺在 **Ficoll-Paque®** 密度梯度上, 并在 18℃ 下 300x g 离心 25min。将富含 PMN 的级分重悬在 500μL 1X PBS 中, 并使用低渗休克进行红细胞裂解。向细胞沉淀中加入 20mL 冰冷的无菌的、不含内毒素的蒸馏水, 并允许进行 30-40 秒裂解, 之后加入 20mL 2X PBS。温和混合样品, 并在 18℃ 下 300x g 离心 10min, 以获得粒细胞。将粒细胞沉淀重悬在 500μL 1x PBS 中, 用 50mL of 1x PBS 洗涤 2 次。将粒细胞沉淀重悬在 RPMI 1640, pH 7.4 加 2.5% FBS 中, 计数并稀释至终浓度 2×10^6 /mL。使用具有 Becton Dickinson 的 3μm PET 膜的 transwell 平板测量迁移。简而言之, 在将多孔的插入片段降低进入位置之前, 向平板的孔底加入 6nM GR0α (EC₈₀-EC₁₀₀) (1000μL/孔), 然后, 向插入片段加入已经用不同浓度的纳米抗体 (单价为 0.13-1000nM, 或双互补位为 0.6pM-30nM) 预孵育过的 PMN, RT 下 30 分钟 (500μL/孔)。然后, 在 37℃ 孵育平板 90 分钟, 使用 FACSCalibur 流式细胞仪计数已经迁移到底部腔室内的细胞。将流式细胞仪设置为对在 FSC/FL-2 图上 R2 门内的事件数进行计数, 每个样品设定时间为 20 秒。

[0451] (3) 食蟹猴嗜中性粒细胞全血形状改变测定 (CynoWBSC)

[0452] 采集自前肢或后肢的静脉血用 3.8% 柠檬酸钠 (无菌) 抗凝, 比例为 1mL 柠檬酸钠比 9mL 血液。在室温收集血液, 并在使用前预热。在用趋化因子刺激前, 用 CXCR2 纳米抗体在室温下预先孵育 80μL 全血 10min (每个剂量应答 10 个点 ($0.03-1.144 \times 10^{-7}$ μM)); 除了 0 化合物外, 向所有的孔添加 10μL rhGR0α (30nM 近似 EC₇₀₋₉₀ 浓度), 向所述 0 化合物中加入 10μL 形状变化测定缓冲液。温和振荡样品, 在 37℃ 再孵育 5 分钟。然后, 将管放置在冰上, 并加入 250μL 冰冷的优化的 CellFix™ 溶液, 温和振荡试管, 并再孵育 5 分钟, 之后向所有的试管中加入 2mL 裂解缓冲液 (Sigma Aldrich #R7757), 再放置冰上 40-60 分钟。在红细胞裂解后, 在 FACSCalibur 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 上分析样品。通过前向散射/侧向散射 (FSC/SSC) 设门, 随后通过使用来自第一图的经设门的粒细胞的 FSC/FL-2 图, 鉴别细胞群体。在 FL-2 图上区分嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞, 因为后者具有较高的自身荧光。每个样品计数 5000 个事件。

[0453] 表 12-在使用原代嗜中性粒细胞和 rhGR0α 的功能测定中的纯化的单价抗 CXCR2 纳米抗体的 IC₅₀ 值

[0454]

	人 WBSC IC ₅₀ (nM)	食蟹猴 WBSC IC ₅₀ (nM)	人趋化性 IC ₅₀ (nM)
163D2	6.6 ± 3.1	>100	ND
127D1	4.9 ± 2.9	>100	14 ± 9.4
97A9	11.6 ± 5.47	>100	48.5 ± 31
163E3	9.4 ± 6.2	>100	9.3 ± 4
54B12	19.7	>100	ND
2B2	29.5 ± 23.4	>100	212 ± 121

[0455] 多价纳米抗体

[0456] 16. 构建二价纳米抗体

[0457] 使用两种方法构建二价纳米抗体。

[0458] 对编码单价构件的质粒DNA进行PCR扩增。使用Fwd-EVQL-MfeI和编码GlySer接头的部分反向引物,扩增N末端构件,而使用编码GlySer接头的其余部分的正向引物和Rev-TVSS-BstEII (表6) 扩增C末端构件。用MfeI和BamHI消化N末端片段,用BamHI和BstEII消化C末端片段;然后同时将这些连接到pAX100载体中,并转化到大肠杆菌TG-1感受态细胞中。

[0459] 备选地,对编码单价构件的质粒DNA进行不同的PCR扩增。使用Fwd-EVQL-MfeI和Rev-TVSS-BspEI扩增N末端构件,而使用Fwd-EVQL-BamHI和Rev-TVSS-BstEII (表6) 扩增C末端构件。用MfeI和BamHI消化N末端片段,用BspEI和BstEII消化C末端片段。将N末端片段连接(MfeI-BspEI)到含有GlySer接头的编码信息的pAX100-衍生物中,并转化到大肠杆菌TG-1感受态细胞中。从该转化混合物制备质粒DNA,并用BspEI和BstEII消化,然后将C末端片段连接到pAX100载体中,并转化到大肠杆菌TG-1感受态细胞中。

[0460] 分析卡那霉素抗性克隆中存在的插入片段并验证阳性克隆的序列。

[0461] 17. 多价抗CXCR2纳米抗体的序列

[0462] 表13

[0463]

CXCR2001 1	97A9-35GS- 97A9 SEQ ID NO. 44	EVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNA EIVVLVGWWTQRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCVASG SIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNKNT TVYLQMNLSKPEDTAVYYCNAEIVVLVGWWTQRARTGNYWGQGTQVTV VSS
CXCR2001 2	137B7-35GS- 137B7 SEQ ID NO. 45	EVQLVESGGGLVQPQGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGPQKAREW VAGINS DGT TNYADPVKGRFTISRDNKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYCA SGKYRGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEVQLVESGGGLVQPQGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGP QKAREWVAGINS DGT TNYADPVKGRFTISRDNKNTIYLHMDMLKPED TAVYYCASGKYRGQGTQVTVSS
CXCR2001 3	2B2-35GS- 97A9 SEQ ID NO. 46	EVQLVESGGELVQPQGSRLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNLSKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCVASGSIVRINTMGWY RQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSK PEDTAVYYCNAEIVVLVGWWTQRARTGNYWGQGTQVTVSS
CXCR2001 4	97A9-35GS- 2B2 SEQ ID NO. 47	EVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNA EIVVLVGWWTQRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGELVQPQGSRLRLSCAASG SILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADI AKKTMYLQMNLSKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
CXCR2001 5	2B2-35GS- 137B7 SEQ ID NO. 48	EVQLVESGGELVQPQGSRLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNLSKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPQGSVRLSCVASGIIFRLSALGW TRQGPQKAREWVAGINS DGT TNYADPVKGRFTISRDNKNTIYLHMDML KPEDTAVYYCASGKYRGQGTQVTVSS
CXCR2001 6	137B7-35GS- 2B2 SEQ ID NO. 49	EVQLVESGGGLVQPQGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGPQKAREW VAGINS DGT TNYADPVKGRFTISRDNKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYCA SGKYRGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEVQLVESGGELVQPQGSRLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAP GKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADI AKKTMYLQMNLSKPED TAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
CXCR2001 7	97A9-35GS- 137B7 SEQ ID NO. 50	EVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNA EIVVLVGWWTQRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPQGSVRLSCVASGI IFRLSALGWTRQGPQKAREWVAGINS DGT TNYADPVKGRFTISRDNK NTIYLHMDMLKPEDTAVYYCASGKYRGQGTQVTVSS
CXCR2001 8	137B7-35GS- 97A9 SEQ ID NO. 51	EVQLVESGGGLVQPQGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGPQKAREW VAGINS DGT TNYADPVKGRFTISRDNKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYCA SGKYRGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTP GKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTA VYYCNAEIVVLVGWWTQRARTGNYWGQGTQVTVSS
CXCR2001 9	2B2-35GS-2B2 SEQ ID NO. 52	EVQLVESGGELVQPQGSRLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADI AKKTMYLQMNLSKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGELVQPQGS

[0464]

		LRLSCAASGSILTNAMGWYRQAPGKQRELVRRTRGSGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNLSKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
CXCR2002 0	127D1-35GS- 163D2 SEQ ID NO. 53	EVQLVESGGGLVQAGESLRSLSCAASGTFDFKVMGWYRQPPGKQREGVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREVAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNNAKNTMYLQMNLSKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSS
CXCR2002 1	127D1-35GS- 163E3 SEQ ID NO. 54	EVQLVESGGGLVQAGESLRSLSCAASGTFDFKVMGWYRQPPGKQREGVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREVAAITWRSNGGSAYYADSAKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
CXCR2002 2	163D2-35GS- 163D2 SEQ ID NO. 55	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREVAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNNAKNTMYLQMNLSKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREVAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNNAKNTMYLQMNLSKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSS
CXCR2002 3	163D2-35GS- 163E3 SEQ ID NO. 56	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREVAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNNAKNTMYLQMNLSKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREVAAITWRSNGGSAYYADSAKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
CXCR2002 4	163E3-35GS- 163E3 SEQ ID NO. 57	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREVAAITWRSNGGSAYYADSAKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREVAAITWRSNGGSAYYADSAKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
CXCR2002 5	163D2-35GS- 127D1 SEQ ID NO. 58	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREVAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNNAKNTMYLQMNLSKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGESLRSLSCAASGTFDFKVMGWYRQPPGKQREGVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQVTVSS
CXCR2002 6	163E3-35GS- 127D1 SEQ ID NO. 59	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREVAAITWRSNGGSAYYADSAKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGESLRSLSCAASGTFDFKVMGWYRQPPGKQREGVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQVTVSS
CXCR2002 7	163E3-35GS- 163D2 SEQ ID NO. 60	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREVAAITWRSNGGSAYYADSAKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREVAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNNAKNTMYLQMNLSKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSS
CXCR2002 8	97A9-35GS- 54B12	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQRELVAIDTSGGNINYIDAVKGRFTISRDNNTKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNA

[0465]

	SEQ ID NO. 61	EIVVLVGWWTQRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSEVOLVESGGGLVQAGGSLTSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDN AKPTMYLQMNLSKPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFDWRWGQGTQVTVSS
CXCR2002 9	163E3-35GS- 54B12 SEQ ID NO. 62	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKERE FVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDN AKNTVY LQMNLSKPEDTAVY YCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSEVOLVESGGGLVQAGGSLTSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDN AKPTMYLQMNLSKPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFDWRWGQGTQVTVSS
CXCR2003 0	163D2-35GS- 54B12 SEQ ID NO. 63	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSDYAMGWFRQAPGKERE FVAAITWNGGRVFTYASVKGRFTISRDN AKNTMYLQMNLSKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSEVOLVESGGGLVQAGGSLTSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDN AKPTMYLQMNLSKPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFDWRWGQGTQVTVSS
CXCR2003 1	2B2-35GS- 163E3 SEQ ID NO. 64	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILTNAMGWYRQAPGKQREL VVRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADI AKKTMYLQMNLSKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSEVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGW FRQAPGKERE FVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDN AKNTVY LQMNLSKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
CXCR2003 2	2B2-35GS- 163D2 SEQ ID NO. 65	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILTNAMGWYRQAPGKQREL VVRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADI AKKTMYLQMNLSKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSEVOLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSDYAMG WFRQAPGKERE FVAAITWNGGRVFTYASVKGRFTISRDN AKNTMYLQ MNLSKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSS
CXCR2003 3	163E3-35GS- 2B2 SEQ ID NO. 66	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKERE FVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDN AKNTVY LQMNLSKPEDTAVY YCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSEVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILTNAMGWYRQAPGKQREL VVRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADI AKKTMYLQMNLSKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
CXCR2003 4	163D2-35GS- 2B2 SEQ ID NO. 67	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSDYAMGWFRQAPGKERE FVAAITWNGGRVFTYASVKGRFTISRDN AKNTMYLQMNLSKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSEVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILTNAMGWYRQAPGKQREL VVRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADI AKKTMYLQMNLSKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
CXCR2003 5	54B12-35GS- 163E3 SEQ ID NO. 68	EVQLVESGGGLVQAGGSLTSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQREL VAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDN AKPTMYLQMNLSKPEDTAVYYC HAGTQDRTGRNFDWRWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSEVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKERE FVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDN AKNTVY LQMNLSKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
CXCR2003 6	54B12-35GS- 163D2 SEQ ID NO. 69	EVQLVESGGGLVQAGGSLTSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQREL VAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDN AKPTMYLQMNLSKPEDTAVYYC HAGTQDRTGRNFDWRWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSEVOLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSDYAMGWFRQAPGKERE FVAAITWNGGRVFTYASVKGRFTISRDN AKNTMYLQMNLSKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSS

[0466] 18. 配体竞争测定

[0467] 在人和食蟹猴CXCR2的FACS配体竞争测定中,用3nMFMAT-Blue-标记的Gro- α 滴定

多价抗CXCR2纳米抗体(表14)。对于人CXCR2,封闭效价的范围在两位数nM和低于-nM之间,而对于食蟹猴CXCR2,其范围在一位至两位数nM之间。。

[0468] 表14-多价抗CXCR2纳米抗体的配体竞争分析

[0469] 19.使用重组细胞系的功能性测定

[0470] (1) 测量激动剂诱导的胞内钙释放 (FLIPR)

[0471] 将表达人或食蟹猴CXCR2受体的RBL细胞接种在96孔板中,并在37℃孵育过夜。在实验当天,于37℃用Fluo-4染料装载细胞30min,随后用纯化的多价抗CXCR2纳米抗体孵育30分钟。最后,使用荧光成像平板阅读器 (FLIPR) 添加GRO-α,随后检测与胞内钙释放对应的荧光信号。使用表达人CXCR1的L2071细胞和IL-8作为激动剂,以及内源性表达CXCR4的CEM细胞和SDF-1作为激动剂实施选择性测定,然而测定规程与关于CXCR2所述仍然是相同的。表15中显示了对平均IC₅₀值的概括,此外,在测试的CXCR1或CXCR4浓度(1μM最大浓度)下,测试的纳米抗体无一显示出对激动剂诱导的胞内钙释放的任何抑制作用。

[0472] (2) 测量激动剂刺激的 [³⁵S]GTP γ S 积累

[0473] 在96孔板中,用激动剂 (GRO-α、IL-8或ENA-78)、GDP、SPA珠和从表达人CXCR2受体的CHO细胞制备的CHO-CXC2膜,孵育纯化的多价抗CXCR2纳米抗体60分钟。随后添加 [³⁵S]GTP γ S,再孵育60分钟。最后,先于在Topcount上读数前,离心平板。表15中显示了对平均IC₅₀值的概括。

[0474] 表15-在使用重组细胞系测量胞内钙释放的功能性测定中,纯化的多价抗CXCR2纳米抗体的IC₅₀值

[0475]

		人 CXCR2	食蟹猴 CXCR2
--	--	---------	-----------

[0476]

		IC ₅₀ (M)	最大 % 抑制	IC ₅₀ (M)	最大 % 抑制
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

[0477] *在测试浓度下,曲线固定为100%抑制,因为没有获得任何平台。ND-未测定。

[0478] 表16-在测量 [³⁵S]GTP γ S 在人CHO-CXCR2细胞膜中积累的功能性测定中,纯化的多价抗CXCR2纳米抗体的IC₅₀值

[0479]

		人 CXCR2 (使用不同激动剂)					
		GRO-α		IL-8		ENA-78	
		IC ₅₀ (M)	最大 % 抑制	IC ₅₀ (M)	最大 % 抑制	IC ₅₀ (M)	最大 % 抑制
CXCR20014	97A9-35GS-2B2	1.38E-9	100	1.13E-9	100	1.66E-9	100

[0480]

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

[0481] ND-未测定

[0482] (3) 确定抗CXCR2纳米抗体作用机制的Schild分析

[0483] 使用IL-8和GRO- α 刺激的 $[^{35}\text{S}]$ GTP γ S积累测定,进行Schild分析。该测定模式允许在添加 $[^{35}\text{S}]$ GTP γ S之前,平衡激动剂和纳米抗体,从而应该可以避免任何可能导致对机制误解的半平衡的人为因素。为此,在存在递增浓度的纳米抗体的条件下,确定激动剂的浓度响应曲线。以两个单价纳米抗体54B12和163E3,以及获得的多价纳米抗体为例,显示在图1中。数据显示了GRO- α 的浓度响应曲线,但使用IL-8时也观察到相似的数据。

[0484] 单价纳米抗体54B12和163E3都表现出变构的作用机制,但对激动剂的抑制具有不同的影响。通过在低纳米抗体浓度时激动剂浓度响应曲线的平行右移,而所述相应曲线在存在增加浓度的纳米抗体的条件下,不会进一步向右移动来示例54B12和其他1-19结合子的变构机制(图1(a))。在不减弱最大激动剂响应的条件下,该效应的可饱和本质提示了对激动剂亲和力的变构作用。相反,163E3和其他非1-19结合子的变构机制示例为在较高纳米抗体浓度时,激动剂浓度响应曲线的平行右移与最大激动剂响应降低的组合(图1(b))。该作用可能是可饱和的,但在所用浓度下未观察到;而关键的观察结果是最大激动剂响应降低,这提示了对激动剂功效的变构效应。最后,双互补位纳米抗体54B12-163E3组合了两种变构机制以对激动剂浓度响应曲线产生影响,所述机制示例为在低得多的纳米抗体浓度下平行右移,和最大激动剂响应的显著减弱(图1(c))。也测试了双互补位纳米抗体127D1-163E3、127D1-163D2和54B12-163D2并显示具有相似的性质(数据未显示)。

[0485] 与图1中说明的相同的性质也显示在图2中,图2显示当测试抑制GRO- α 的能力时,代表性的结合分子127D1是有效能的,但不有效,然而另一个结合分子163E3具有较低的效能,但比127D1更有效。当组合这两个结合分子时,显示获得的双互补位结合分子既是有效能的又是有功效的。结论是,已经显示本发明的双互补位分子就功效和效能而言具有比单体纳米抗体更好的性质。在下表中描述了IC₅₀值。

[0486]

纳米抗体	指明的 GRO α 的浓度(nM)时的 IC ₅₀ (M)			
	5	15	45	150
127D1	1.642E-09	2.045E-09	3.264E-09	4.602E-09
163E3	3.031E-08	4.044E-08	7.543E-08	1.868E-07
163E3-127D1	6.532E-10	1.983E-09	1.614E-08	6.713E-08

[0487] 对变构调节物的现有定义是所述调节物结合在不同于激动剂(正构(orthosteric)配体)结合位点的位点上,且正构配体和变构调节物同时与受体结合。虽然发明人目前没有数据验证这一点,且不希望受理论约束,但仍不认为纳米抗体结合位点不同于激动剂结合位点,而是上述结合位点是重叠的。同样也没有可获得的数据显示激动剂和纳米抗体同时结合受体,尽管Schild分析的数据提示了这些纳米抗体是CXCR2的变构调节物。

[0488] 20. 功能性测定-NSC

[0489] 方法与15节所述相同

[0490] 表17-在使用原代人或食蟹猴嗜中性粒细胞的功能性测定中,纯化的双互补位抗CXCR2纳米抗体的IC₅₀值(vs rhGRO α ,平均值 $\pm$ SD)

[0491]

	人 WBSC IC ₅₀ (nM)	食蟹猴 WBSC IC ₅₀ (nM)	人趋化性 IC ₅₀ (nM)
97A9-2B2	0.445 $\pm$ 0.08	0.16 $\pm$ 0.16	0.16 $\pm$ 0
163D2-2B2	0.29 $\pm$ 0.17	0.44 $\pm$ 0.14	0.143 $\pm$ 0.003
163E3-2B2	0.345 $\pm$ 0.15	0.42 $\pm$ 0.12	0.15 $\pm$ 0.02
127D1-163D2	0.17	0.12 $\pm$ 0.09	0.143 $\pm$ 0.009
163E3-127D1	0.165 $\pm$ 0.06	0.26 $\pm$ 0.25	0.14 $\pm$ 0.006
97A9-54B12	0.43 $\pm$ 0.18	1.72 $\pm$ 0.43	ND
163D2-54B12	0.215 $\pm$ 0.02	0.56 $\pm$ 0.46	ND
54B12-163E3	0.24 $\pm$ 0.155	0.43 $\pm$ 0.38	ND

[0492] 表18

[0493]

143B03	SEQ ID NO. 192	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTC AGTACCTACTGGATGTATTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGG GCTCGACTGGGTCTCAGCTATTAATGCTGGTGGTGATAGCACAT ACTATGCAGACCCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC AACAACAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAACC TGAGGACACGGCCCTGTATTACTGTGCGACCGTACGAGGCACA GCTCGTGACTTGGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCG TCTCCTCA
139D05	SEQ ID NO. 193	GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCTCTCTGGAAGGATCGGC AGTATCAACGCCATGGGCTGGTATCGCCAGGTTTCAGGACAACA GCGCGAGTTGGTCCAGTAAGCAGGAGCGGAGGTAGCACAGAC ATTGCTGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAA CGGCAAGAACACAGTGTATCTGCAGATGGACAGCCTGAAACCTG AGGACACGGCCGCTATTACTGTTATGCTCATACTTCAAGCTATA GTAATTGGCGAGTCTACAATAACGACTACTGGGGCCAGGGGACC CAGGTCACCGTCTCCTCA
146A06	SEQ ID NO. 194	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTTACCTGTGCAGCCTCTGGACGCATCGG CACTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAG CAGCGCCAGTTGCTCCAGTTATTACTAGTGGTGGTAGGATAGA CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA ATGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCT GAGGACACGGCCGCTATTACTATAATGTAGAAACGGTAGTGGG TGCCGTCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

[0494]

147A01	SEQ ID NO. 185	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGGATGGG CAATATCAATGCCATGGGCTGGTATCGCCAGGCTCCAGGGAAGG AGCGCGAGTTGGTCCGAAAAATTACTAGGGGTGGTGCAGATAACC TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCGCCAGAGACAA TATTCTGAACACGCGTATCTGCAAATGAACGACCTGAAACCTGA GGACACGGCCGTCTATTATTATAATGTAGATGGGGGGCCCAAGTC AAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
145C09	SEQ ID NO. 186	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTC GATGATTATGCCATAGGCTGGTTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGG AGCGTGAGAGGGTCTCATGTATTAGTGGTAGTGATGGTAGCACA TACTATGCAGACTCCGTCAAGGGCCGATTACCATCTCCAGTGA CAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAAC CCGAGGACACGGCCGTTTATTATTGTGCAGCATATTGGGGACTA ACGCTCAGGCTATGGATGCCCCCCCACCGGTATGACTACTGGG GCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
145D03	SEQ ID NO. 187	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGCCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTTATCTTC AGACTCAGTGGCATGGCCTGGTATCGCCAGGCTCCGGGGAGGGC AGCGCGAGTGGTCCGAGTGCTTACCAAAGATGGTACCCTACAC TATGCAGACCCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAAACAA CGCCGAGAACACGTGGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG AGGACACAGCCATCTATTACTGTAATACGGGCCGTTACTGGGGC CAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
144D01	SEQ ID NO. 188	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCACTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAACCATCGG CACGATCAGAGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAG CAGCGCGAGTTGGTCCGATTGATTACTAGTACTGGTAGGATAAA CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATTTGGAAGAGACA ATGDCAAAGAACACGGGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAACCT GAGGACACGGCCGTCTATTACTATAATATCGAAACACTACGACGT AACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
139H02	SEQ ID NO. 189	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTT AGTAACTATGCCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCCACAGGGAAGG AGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTAACAAGAGTGGTGGGAACACA CACTATGCAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTAGGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCGTCCCGGACTAAC

[0495]

		CCTAAGCCTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
139A08	SEQ ID NO. 200	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGACAGGCTGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCTCCTTCAGTCGCAGTGCCATGGGCTGGCTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAATTTGTAGCAGGTATTAGCTGGGGTGGTGATAACTCA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACCGTGTCTCTACAAATGAACAGCCTGAAACCTCAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAAGATACCGGGGAGGCGCGGCAGTAGCTGGTTGGGAGTACTGGGGCCAGGGGACCAGGTCACCGTCTCCTCA
137A08	SEQ ID NO. 201	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGACAGCCTGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACTTTGGCCTATTATACCGTAGGCTGGTTCCGCCGGGCCCCAGGGAAGGAGCGCAGGGGATCTCATGTATTAGTAGTAGTGATGGTAGCACA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAATACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGGCTGACAGACGTACCGACTGTAAAAGGGTAGAGTCGGTTCTGGTTCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
143A05	SEQ ID NO. 202	AAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGACAGGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGACGCGCCTTCAATTACTATGTATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCAAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTAGCACGCGTGGTAGTATGACAAAGTATTCAGACTCCGTGCAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCACATGAACAGCCTGAAACCTGAGGATACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAGACCCCTCGCGGCAGTAGCTGGTCATTTTCGTCCGGGGGTTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
137B07	SEQ ID NO. 203	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGACAGCCTGGGGGTCTGTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGAATCATCTTCAGACTCAGTGCGTTGGTTGGACACGCCAGGGTCCAGGGAAGGCGCGCAGTGCGTCCGAGGTATTAACAGTGATGGTACGACCAACTACGCCGACCCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGATATATCTGCACATGGACATGCTGAAACCTGAGGATACGGCCGTCTATTACTGTGCCTCCGGAAAGTACCGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
127D01	SEQ ID NO. 204	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGACAGGCTGGGAGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCACCTTCGATTTCAAAGTCATGGGCTGGTACCGCCAGCCTCCAGGGAAGCAGCGAGGGGGTCCGACGGATTAGGCTTAGTGGTAACATGCAC

[0496]

		TATGCAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTDCAAAGCCAA CGCDAAGAACACAGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTG AGGACACGGCCGTCTATTACTGTAAGGTGAACATTCGGGGCCAG GACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
126B11	SEQ ID NO. 205	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGACGCTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAAGCTCCTTC AGAATCAATACCATGGGCTGGTACDGGCCGGGCTCCAGGGAAGC AGCGCGAGTTGGTCCAGCTCGTGATAGAGGTGGTTACATAAAC TATGTAGATTCCGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAA CGCCAAGCCCAATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG AGGACACGGCCGTCTATTATTGTCATGCCGGGACCCAGATCGG ACGGGTCCGAATTTCCAGCACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCA CCGTCTCCTCA
097A09	SEQ ID NO. 206	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGAAGCATCGTC AGAATTAATACCATGGGCTGGTACCGCCAGACTCCAGGGAAGCA GCGCGAGTTGGTCCAGATATTACAGTGGTGGTAACATAAACT ATATAGACGCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAC ACCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGA GGACACGGCCGTCTATTACTGTAATGCAGAGATCGTTGTTCTGG TGGGAGTTTGGACCCAGCGTGCGCGGACCGGCAACTACTGGGG CCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
159B10	SEQ ID NO. 207	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACGTTT AGTAGCTTGCCATGGGCTGGTTCGCCAGGCTCCGGGGAAGG AGCGTGCCCTTTGTAGCAGCGCTTACTCGAAATGGTGGTTACAGA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CGTCCCAAGAAGACCTTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCAGATAGTCTTAGT GGTAGTGACTACTTAGGAACCAACCTAGACTACTGGGGCCAGGG GACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
163D02	SEQ ID NO. 208	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCCTG GGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTC AGTGACTATGCCATGGGCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGG AGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTACGTGGAATGGTGGTAGAGTA TTTTATACTGCCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CAACGCCAAGAACACGATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCAGATAAAGACAGA CGTACTGACTATCTAGGGCACCCCGTTGCCTACTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
163E03	SEQ ID NO. 209	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCCTG GGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGACGCATCTTC

[0497]

		AGTAGCAATGCCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG AGCGTGAGTTTGTAGCGGCCATTACCTGGAGGAGTGGCGGTAG CGCGTACTATGCAGACTCCGCGAAGGGCCGATTCACCATCTCCA GAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATTTGCAAATGAACAGCCTG AAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTATTGTGCAGCTGGTGGTAG TTCCTGGTTAAGTTTTCCGCCGGACTACTGGGGCCAGGGGACCC AGGTCACCGTCTCCTCA
2B2	SEQ ID NO. 210	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGAGTTGGTGCAGCCG GGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTT AACTATCAATGCCATGSGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAG CAGCGCGAGTTGGTAGTCCGTAGGACTAGGGGTGGTAGTACAA CGTATCAAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCGCAGAC ATTGCCAAGAAAACGATGTATCTCCAAATGAACAGCCTGAAACCT GAAGACACGGCCGTCTATTACTGTATGCTAGATGACCGTGGGGG TGTCTACTGGGGTCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
54B12	SEQ ID NO. 211	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGACGCTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAAGCACCTTC AGAATCAATACCATGGGCTGGTACCGCCGGGCTCCAGGGAAGC AGCGCGAGTTGGTCCGAGCTCGTGATAGAGGTGGTTACATAAAC TATGTAGATTCCGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAA CGCCAAGCCCACAATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG AGGACACGGCCGTCTATTATTGTATGCCGGGACCCAAGATCGG ACGGGTGGGAATTTGACCGCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCA CCGTCTCCTCA

[0498]

插入图表-CDR+FR CXCR2 Kabat

表 19

	框架 1		框架 2		框架 3		框架 4	
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR4	CDR5	CDR6	CDR7	CDR8
143B03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 70	YYTAYG SEQ ID NO. 132	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 91	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 91	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 152	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 111	VRRGARDLGY SEQ ID NO. 172	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
139D05	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 71	YYTAYG SEQ ID NO. 133	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 92	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 92	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 153	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 112	HTSSYSNRVYNNNDY SEQ ID NO. 173	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
145C09	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 72	YYTAYG SEQ ID NO. 134	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 93	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 93	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 154	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 113	YAGLTLRLWMPHRYDY SEQ ID NO. 174	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
145D03	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 73	YYTAYG SEQ ID NO. 135	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 94	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 94	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 155	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 114	GRY SEQ ID NO. 175	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
139H02	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 74	YYTAYG SEQ ID NO. 136	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 95	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 95	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 156	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 115	SRTPKPDY SEQ ID NO. 176	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
139A08	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 75	YYTAYG SEQ ID NO. 137	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 96	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 96	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 157	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 116	RYRGGAAVAGWEY SEQ ID NO. 177	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
137A08	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 76	YYTAYG SEQ ID NO. 138	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 97	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 97	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 158	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 117	DRRTDKKGRVGGGS SEQ ID NO. 178	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
143A05	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 77	YYTAYG SEQ ID NO. 139	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 98	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 98	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 159	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 118	DPFGSSWSFSSGGYDY SEQ ID NO. 179	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
137B07	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 78	YYTAYG SEQ ID NO. 140	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 99	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 99	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 160	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 119	GRY SEQ ID NO. 180	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
127D01	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 79	YYTAYG SEQ ID NO. 141	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 100	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 100	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 161	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 120	NRGGDY SEQ ID NO. 181	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
126B11	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 80	YYTAYG SEQ ID NO. 142	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 101	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 101	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 162	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 121	GTQRTGRNFDH SEQ ID NO. 182	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
097A09	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 81	YYTAYG SEQ ID NO. 143	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 102	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 102	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 163	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 122	EIVLVGVGTQRTAGTNY SEQ ID NO. 183	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
159B10	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 82	YYTAYG SEQ ID NO. 144	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 103	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 103	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 164	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 123	DSLSSDYLGNTLDY SEQ ID NO. 184	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
163D02	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 83	YYTAYG SEQ ID NO. 145	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 104	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 104	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 165	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 124	DKRRTDYLGHPVAY SEQ ID NO. 185	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
163E03	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 84	YYTAYG SEQ ID NO. 146	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 105	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 105	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 166	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 125	GGSSWLPFPDY SEQ ID NO. 186	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
002B02	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 85	YYTAYG SEQ ID NO. 147	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 106	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 106	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 167	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 126	DDRGGVY SEQ ID NO. 187	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
146A06	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 86	YYTAYG SEQ ID NO. 148	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 107	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 107	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 168	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 127	ETVVGAVY SEQ ID NO. 188	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
147A01	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 87	YYTAYG SEQ ID NO. 149	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 108	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 108	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 169	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 128	DGGPSQNY SEQ ID NO. 189	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
144D01	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 88	YYTAYG SEQ ID NO. 150	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 109	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 109	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 170	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 129	ETLRNRY SEQ ID NO. 190	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
054B12	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 89	YYTAYG SEQ ID NO. 151	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 110	WVRQAPGKGLDWW S SEQ ID NO. 110	AINAGGDSSTYYADPV KG SEQ ID NO. 171	RFTISRNNKNTLYLQMNLSL PEDTAVYYCA SEQ ID NO. 130	GTQRTGRNFDH SEQ ID NO. 191	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131

[0499] 21. 序列优化-CXCR2拮抗多肽

[0500] 热移测定(TSA): 在10μl缓冲液(100mM磷酸盐, 100mM硼酸盐, 100mM柠檬酸盐,

115mM NaCl,在3.5-9的不同pH范围内缓冲)中,将5 μ l纯化的单价纳米抗体(80mg/ml)与5 μ l荧光探针Sypro Orange (Invitrogen,Carlsbad,CA,货号#S6551)(终浓度10x)混合。然后,在LightCycler 480II仪器(Roche,Basel,Switzerland)中加热样品,以4.4 $^{\circ}$ C/s从37加热至90 $^{\circ}$ C,之后,以2.2 $^{\circ}$ C/s冷却至37 $^{\circ}$ C。在热诱导解折叠后,蛋白质的疏水性斑块暴露并结合Sypro Orange,导致荧光强度增加。荧光强度曲线的第一衍生物的拐点作为熔解温度(T_m)的测量值(Ericsson等人2006(Annals of Biochemistry,357:289-298)。

[0501] 差异扫描量热法(DSC):根据生产商的说明,在Auto-Cap VP-DSC(MicroCal-GE Healthcare)上进行实验。在从30 $^{\circ}$ C-95 $^{\circ}$ C的温度范围中,以1 $^{\circ}$ C/min的加热速率实施纳米抗体(0.25mg/mL)的熔解温度确定。在减去适当的基线后,获得最终的温谱图。软件驱动的(Origin 7.0)峰检测产生相应的熔解温度。

[0502] 强制氧化:与不含H₂O₂的对照样品平行地,在RT和黑暗中使纳米抗体样品(1mg/mL)接受PBS中的10mM H₂O₂4小时,再使用Zeba脱盐离心柱(0.5mL)(Thermo Scientific)将缓冲液转换为PBS。然后,在70 $^{\circ}$ C,在Series 1200仪器(Agilent Technologies)上,通过Zorbax 300SB-C3柱(Agilent Technologies),通过RPC分析受胁迫的样品和对照样品。通过确定与主蛋白质峰相比,作为氧化胁迫出现的峰前的%峰面积,定量纳米抗体的氧化。

[0503] 2B2序列优化

[0504] 比对亲代2B2与人VH3-23(DP-47)和JH5种系的蛋白质序列(表20,第147页)。用字母表示相对于人种系序列的氨基酸差异,用点表示相同的氨基酸。选择有下划线的氨基酸差异用于转化为人对应物,而其他保持不变。

[0505] 从2B2、CXCR20059和CXCR20063生产纯化的单价材料,然后在对人和食蟹猴CXCR2的FACS配体竞争测定和激动剂诱导的胞内钙释放(FLIPR)测定中表征所述材料。此外,在热移测定(TSA)中或由差异扫描量热法(DSC)确定变体的熔解温度(表21)。CXCR20059和CXCR20063中的M93L突变消除了亲代2B2对强制氧化的敏感性。

[0506] 表21-单价2B2和序列优化的变体的功能性表征

[0507]

	T_m ($^{\circ}$ C)	FACS hGro- α 竞争 IC50 (M)		FLIPR hGro- α IC50 (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
2B2	73.7	1.3 X 10⁻⁰⁹	3.5 X 10⁻⁰⁸	6.5 X 10⁻⁰⁷	2.4 X 10⁻⁰⁵
CXCR20059	73.4	1.5 X 10⁻⁰⁹	1.9 X 10⁻⁰⁸	3.9 X 10⁻⁰⁷	1.9 X 10⁻⁰⁵
CXCR20063	71.9	nd	5.4 X 10⁻⁰⁸	6.1 X 10⁻⁰⁶	2.4 X 10⁻⁰⁵

[0508] 97A9序列优化

[0509] 比对亲代97A9与人VH3-23(DP-47)和JH5种系的蛋白质序列(表22,第147页)。用字母表示相对于人种系序列的氨基酸差异,用点表示相同的氨基酸。选择有下划线的氨基酸差异用于转化为人对应物,而其他保持不变。

[0510] 从97A9和CXCR20061生产纯化的单价材料,然后在对人和食蟹猴CXCR2的FACS配体

竞争测定和激动剂诱导的胞内钙释放 (FLIPR) 测定中表征所述材料。此外,在热移测定 (TSA) 中确定变体的熔解温度 (表23)。

[0511] 表23-单价979A9和序列优化的变体的功能性表征

[0512]

	Tm (°C)	FACS hGro- α 竞争 IC50 (M)		FLIPR hGro- α IC50 (M)	
ID		hCXCR2 对照	cCXCR2 对照	hCXCR2	cCXCR2
97A9	76.5	1.2 X 10⁻⁰⁸	6.3 X 10⁻⁰⁸	9.4 X 10⁻⁰⁸	8.0 X 10⁻⁰⁷
CXCR20061	80.2	1.5 X 10⁻⁰⁸	6.2 X 10⁻⁰⁸	6.6 X 10⁻⁰⁸	3.5 X 10⁻⁰⁷

[0513] 163E3序列优化

[0514] 比对亲代163E3与人VH3-23 (DP-47) 和JH5种系的蛋白质序列 (表24,第147页)。用字母表示相对于人种系序列的氨基酸差异,用点表示相同的氨基酸。选择有下划线的氨基酸差异用于转化为人对应物,而其他保持不变。

[0515] 从163E3和CXCR20076生产纯化的单价材料,然后在对人和食蟹猴CXCR2的FACS配体竞争测定和激动剂诱导的胞内钙释放 (FLIPR) 测定中表征所述材料。此外,在热移测定 (TSA) 中确定变体的熔解温度 (表25)。

[0516] 表25-单价163E3和序列优化的变体的功能性表征

[0517]

	Tm (°C)	FACS hGro- α 竞争 IC50 (M)		FLIPR hGro- α IC50 (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
163E3	74.4	1.0 X 10⁻⁰⁸	2.2 X 10⁻⁰⁸	3.5 X 10⁻⁰⁸	1.5 X 10⁻⁰⁷
CXCR20076	77.3	1.6 X 10⁻⁰⁸	2.5 X 10⁻⁰⁸	3.1 X 10⁻⁰⁸	1.0 X 10⁻⁰⁷

[0518] 127D1序列优化

[0519] 比对亲代127D1与人VH3-23 (DP-47) 和JH5种系的蛋白质序列 (表26,第147页)。用字母表示相对于人种系序列的氨基酸差异,用点表示相同的氨基酸。选择有下划线的氨基酸差异用于转化为人对应物,而其他保持不变。

[0520] 从127D1和CXCR20079生产纯化的单价材料,然后在对人和食蟹猴CXCR2的FACS配体竞争测定和激动剂诱导的胞内钙释放 (FLIPR) 测定中表征所述材料。此外,在热移测定 (TSA) 中确定变体的熔解温度 (表27)。CXCR20079中的M57R突变消除了亲代127D1对强制氧化的敏感性。

[0521] 表27-单价127D1和序列优化的变体的功能性表征

[0522]

	Tm (°C)	FACS hGro- α 竞争 IC50 (M)		FLIPR hGro- α IC50 (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
127D1	67.2	5.5 X 10⁻¹⁰	6.1 X 10⁻⁰⁹	1.5 X 10⁻⁰⁸	1.1 X 10⁻⁰⁶
CXCR20079	68.6	8.0 X 10⁻¹⁰	2.8 X 10⁻⁰⁹	1.0 X 10⁻⁰⁸	4.5 X 10⁻⁰⁷

[0523] 163D2序列优化

[0524] 比对亲代163D2与人VH3-23 (DP-47) 和JH5种系的蛋白质序列(表28,第148页)。用字母表示相对于人种系序列的氨基酸差异,用点表示相同的氨基酸。选择有下划线的氨基酸差异用于转化为人对应物,而其他保持不变。

[0525] 从163D2和CXCR20086生产纯化的单价材料,然后在对人和食蟹猴CXCR2的FACS配体竞争测定和激动剂诱导的胞内钙释放(FLIPR)测定中表征所述材料。此外,在热移测定(TSA)中确定变体的熔解温度(表29)。

[0526] 表29-单价163D2和序列优化的变体的功能性表征

[0527]

	Tm (°C)	FACS hGro- α 竞争 IC50 (M)		FLIPR hGro- α IC50 (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
163D2	70.7	2.8 X 10⁻⁰⁹	7.1 X 10⁻⁰⁹	6.6 X 10⁻⁰⁸	9.2 X 10⁻⁰⁸
CXCR20086	72.3	2.0 X 10⁻⁰⁹	4.8 X 10⁻⁰⁹	7.3 X 10⁻⁰⁸	8.5 X 10⁻⁰⁸

[0528] 54B12序列优化

[0529] 比对亲代54B12与人VH3-23 (DP-47) JH5种系的蛋白质序列(表30,第148页)。用字母表示相对于人种系序列的氨基酸差异,用点表示相同的氨基酸。选择有下划线的氨基酸差异用于转化为人对应物,而其他保持不变。

[0530] 从54B12、CXCR20103和CXCR2104生产纯化的单价材料,然后在对人和食蟹猴CXCR2的FACS配体竞争测定和激动剂诱导的胞内钙释放(FLIPR)测定中表征所述材料。此外,在热移测定(TSA)中确定变体的熔解温度(表31)。

[0531] 表31-单价54B12和序列优化的变体的功能性表征

[0532]

	Tm (°C)	FACS hGro- α 的竞争 IC50 (M)		FLIPR hGro- α IC50 (M)	
ID		hCXCR2 对照	cCXCR2 对照	hCXCR2	cCXCR2
54B12	64.4	nf*	3.3×10^{-08}	1.5×10^{-07}	1.1×10^{-06}
CXCR20104	tbd	nf*	1.3×10^{-08}	5.9×10^{-8}	3.5×15^{-6}

[0533]

表 20-2B2 和序列优化的变体的比对

Kabat#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	101	110
VH3-23/JH5	:										
CXCR2282	:	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTSSYAMSVWVRQAPGKLEWVS	AISSGSGSYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMSLR	AEADTAVYYCAK	-----	WGQGTIVTVSS				
CXCR20059	:	E	SILTI	N.G.Y.....QR.L.VRRT	R.....T.Q.....A.IA	K.M.....KP.....MLD	RGVY.....Q				
CXCR20063	:	SILTI	N.G.Y.....QR.L.VRRT	R.....T.Q.....A.I	K.M.....P.....LID	RGVY.....P					

VH3-23/JH5 - SEQ ID NO. 212

表 22-97A9 和序列优化的变体的比对

Kabat#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
VH3-23/JH5	:										
CXCR297A9	:	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTSSYAMSVWVRQAPGKLEWVS	AISSGSGSYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMSLR	AEADTAVYYCAK	-----	WGQGTIVTVSS				
CXCR20061	:	V	SIVRI	N.T.....QR.L.AJ	T.....NIN	I.A.....KP.....NAE	IVLWGVTQARTGNY.....Q				

表 24-163E3 和序列优化的变体的比对

Kabat#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
VH3-23/JH5	:										
CXCR2163E3	:	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTSSYAMSVWVRQAPGKLEWVS	AISSGSGSYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMSLR	AEADTAVYYCAK	-----	WGQGTIVTVSS				
CXCR20076	:	V	RI	N.G.F.....ER.F.A	TWR.....A.....A.....V.....KP.....AGG	SMLSFPEDY.....Q					

表 26-127D1 和序列优化的变体的比对

Kabat#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	101	110
VH3-23/JH5	:										
CXCR2127D1	:	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTSSYAMSVWVRQAPGKLEWVS	AISSGSGSYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMSLR	AEADTAVYYCAK	-----	WGQGTIVTVSS				
CXCR20079	:	V	A.E	S.DFKV	G.Y.....P.....QR.G.A	R-LS.NRH.E.....KA.A	V.....P.....KVN	IRQDY.....Q			

[0534]

表 28 - 163D2 和序列优化的变体的比对

Kabat#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
VH3-23/JH5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SYANSWRQAPGKGL	EWGAI	SGSGGTY	YADSVKGR	FTISR	DN	SKNTLYLQ	MNSLR	ADTAVYCAK
CXCR2163D2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SYANSWRQAPGKGL	EWGAI	SGSGGTY	YADSVKGR	FTISR	DN	SKNTLYLQ	MNSLR	ADTAVYCAK
CXCR20086	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SYANSWRQAPGKGL	EWGAI	SGSGGTY	YADSVKGR	FTISR	DN	SKNTLYLQ	MNSLR	ADTAVYCAK

表 30 - 54B12 和序列优化的变体的比对

Kabat#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
VH3-23/JH5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SYANSWRQAPGKGL	EWGAI	SGSGGTY	YADSVKGR	FTISR	DN	SKNTLYLQ	MNSLR	ADTAVYCAK
CXCR254B12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SYANSWRQAPGKGL	EWGAI	SGSGGTY	YADSVKGR	FTISR	DN	SKNTLYLQ	MNSLR	ADTAVYCAK
CXCR20103	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SYANSWRQAPGKGL	EWGAI	SGSGGTY	YADSVKGR	FTISR	DN	SKNTLYLQ	MNSLR	ADTAVYCAK
CXCR20104	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SYANSWRQAPGKGL	EWGAI	SGSGGTY	YADSVKGR	FTISR	DN	SKNTLYLQ	MNSLR	ADTAVYCAK

表 32 - 序列优化的变体的氨基酸序列

CXCR20059	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SYANSWRQAPGKGL	EWGAI	SGSGGTY	YADSVKGR	FTISR	DN	SKNTLYLQ	MNSLR	ADTAVYCAK
CXCR20063	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SYANSWRQAPGKGL	EWGAI	SGSGGTY	YADSVKGR	FTISR	DN	SKNTLYLQ	MNSLR	ADTAVYCAK
CXCR20061	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SYANSWRQAPGKGL	EWGAI	SGSGGTY	YADSVKGR	FTISR	DN	SKNTLYLQ	MNSLR	ADTAVYCAK
CXCR20079	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SYANSWRQAPGKGL	EWGAI	SGSGGTY	YADSVKGR	FTISR	DN	SKNTLYLQ	MNSLR	ADTAVYCAK
CXCR20076	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SYANSWRQAPGKGL	EWGAI	SGSGGTY	YADSVKGR	FTISR	DN	SKNTLYLQ	MNSLR	ADTAVYCAK
CXCR20086	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SYANSWRQAPGKGL	EWGAI	SGSGGTY	YADSVKGR	FTISR	DN	SKNTLYLQ	MNSLR	ADTAVYCAK
CXCR20104	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SYANSWRQAPGKGL	EWGAI	SGSGGTY	YADSVKGR	FTISR	DN	SKNTLYLQ	MNSLR	ADTAVYCAK

[0535]

表 33 序列优化的双互补位 (包括具有 A1b8 的 HLE) 的氨基酸序列

CXCR20079-35GS-CXCR20076	SEQ ID NO. 221	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLSGNRHYAESVKGRFTISRANSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIHQDYGQGLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGFRQAPGKREFVAAITWRSGSAYYADSVKGRFTISRANSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGGSWLSFPPDYWGQGLTVTVSS
CXCR20079-35GS-CXCR20086	SEQ ID NO. 222	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLSGNRHYAESVKGRFTISRANSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIHQDYGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRITFDYAMGNFRQAPGKREFVAAITWNGRVTFTASVKGRFTISRNSK NTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPAWYWGQGLTVTVSS
CXCR20104-35GS-CXCR20076	SEQ ID NO. 223	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFRINTMGWYRQAPGKQRELVAARDGGVINYVDSVKGRFTISRNSKP TMYLQMNSLRPEDTAVYYCHAGTQDKTGRNFDWQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGFRQAPGKREFVAAITWRSGSAYYADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGGSWLSFPPDYWGQGLTVTVSS
CXCR20104-35GS-CXCR20086	SEQ ID NO. 224	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFRINTMGWYRQAPGKQRELVAARDGGVINYVDSVKGRFTISRNSKP TMYLQMNSLRPEDTAVYYCHAGTQDKTGRNFDWQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRITFDYAMGNFRQAPGKREFVAAITWNGRVTFTASVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPAWYWGQGLTVTVSS
CXCR20079-35GS-CXCR20076-35GS-A1b8	SEQ ID NO. 225	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLSGNRHYAESVKGRFTISRANSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIHQDYGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGFRQAPGKREFVAAITWRSGSAYYADSVKGRFTISRANSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGGSWLSFPPDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSSIISGSGSDTLVADSVKGRFTISR NAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSQQGLTVTVSS
CXCR20079-35GS-CXCR20061-35GS-A1b8	SEQ ID NO. 226	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLSGNRHYAESVKGRFTISRANSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIHQDYGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIVRINTMGWYRQAPGKQRELVAADITSGGNINYADSVKGRFTISRANSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCNAELVVLVWVWQRTARTGNVWQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGSGGGSGGSEVQLVESSGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSSIISGSGSDTLVADSVKGR FTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSQQGLTVTVSS
CXCR20079-35GS-CXCR20086-35GS-A1b8	SEQ ID NO. 227	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLSGNRHYAESVKGRFTISRANSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIHQDYGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRITFDYAMGNFRQAPGKREFVAAITWNGRVTFTASVKGRFTISRANSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPAWYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSSIISGSGSDTLVADSVKGRFTISR NAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSQQGLTVTVSS
A1b8	SEQ ID NO. 228	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSSIISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDNKTT LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSQQGLTVTVSS

[0536]

表34-序列优化的变体和亲代的氨基酸序列，包括对 CDR (kabat) 和框架区的注释

	框架 1	CDR1	框架 2	CDR2	框架 3	CDR3	框架 4
CKCR2005 9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIT SEQ ID NO. 229	INAMG SEQ ID NO. 147	WYRQAPGKQRELVA SEQ ID NO. 106	RRTRGGSTTYQDSVKG SEQ ID NO. 167	RFTISADISKNTMYLQMNLSL RPEDTAVYICLL SEQ ID NO. 238	DDRGVY SEQ ID NO. 187	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
CKCR2006 3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIT SEQ ID NO. 229	INAMG SEQ ID NO. 147	WYRQAPGKQRELVA SEQ ID NO. 106	RRTRGGSTTYQDSVKG SEQ ID NO. 167	RFTISADISKNTMYLQMNLSL RPEDTAVYICLL SEQ ID NO. 239	DDRGVY SEQ ID NO. 187	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
002B02	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIT SEQ ID NO. 85	INAMG SEQ ID NO. 147	WYRQAPGKQRELVA SEQ ID NO. 106	RRTRGGSTTYQDSVKG SEQ ID NO. 167	RFTISADISKNTMYLQMNLSL RPEDTAVYICLL SEQ ID NO. 126	DDRGVY SEQ ID NO. 187	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 131
CKCR2006 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIT SEQ ID NO. 230	INTMG SEQ ID NO. 143	WYRQAPGKQRELVA SEQ ID NO. 234	DITSGNINIVYADSVKG SEQ ID NO. 235	RFTISRDNKNTVYLOMNLSL RPEDTAVYICNA SEQ ID NO. 240	EIVVLGVWVQBARIGNY SEQ ID NO. 183	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
097A09	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIT SEQ ID NO. 81	INTMG SEQ ID NO. 143	WYRQAPGKQRELVA SEQ ID NO. 102	DITSGNINIVYADSVKG SEQ ID NO. 163	RFTISRDNKNTVYLOMNLSL RPEDTAVYICNA SEQ ID NO. 122	EIVVLGVWVQBARIGNY SEQ ID NO. 183	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 133
CKCR2007 9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIT SEQ ID NO. 231	FKVMG SEQ ID NO. 141	WYRQAPGKQRELVA SEQ ID NO. 235	AIRLSGNHYVAESVKG SEQ ID NO. 236	RFTISRANKNVYLOMNLSL RPEDTAVYICV SEQ ID NO. 241	NIRGQDY SEQ ID NO. 181	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
127D01	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIT SEQ ID NO. 73	FKVMG SEQ ID NO. 141	WYRQAPGKQRELVA SEQ ID NO. 100	AIRLSGNHYVAESVKG SEQ ID NO. 161	RFTISRANKNVYLOMNLSL RPEDTAVYICV SEQ ID NO. 120	NIRGQDY SEQ ID NO. 181	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 131
CKCR2007 5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIT SEQ ID NO. 232	SNAMG SEQ ID NO. 146	WYRQAPGKQRELVA SEQ ID NO. 105	AITWRSGLSAYYADSVKG SEQ ID NO. 237	RFTISRDNKNTVYLOMNLSL RPEDTAVYICAA SEQ ID NO. 242	GGSSWLSPEPDY SEQ ID NO. 186	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
163E03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIT SEQ ID NO. 84	SNAMG SEQ ID NO. 146	WYRQAPGKQRELVA SEQ ID NO. 105	AITWRSGLSAYYADSVKG SEQ ID NO. 166	RFTISRDNKNTVYLOMNLSL RPEDTAVYICAA SEQ ID NO. 125	GGSSWLSPEPDY SEQ ID NO. 186	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 131
CKCR2008 6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIT SEQ ID NO. 233	DYAMG SEQ ID NO. 145	WYRQAPGKQRELVA SEQ ID NO. 104	AITWNGGRVFTASVKG SEQ ID NO. 165	RFTISRDNKNTVYLOMNLSL RPEDTAVYICAA SEQ ID NO. 243	DKDRRTDYLGHFVAY SEQ ID NO. 185	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
163D02	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIT SEQ ID NO. 83	DYAMG SEQ ID NO. 145	WYRQAPGKQRELVA SEQ ID NO. 104	AITWNGGRVFTASVKG SEQ ID NO. 165	RFTISRDNKNTVYLOMNLSL RPEDTAVYICAA SEQ ID NO. 124	DKDRRTDYLGHFVAY SEQ ID NO. 185	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 131
CKCR2010 4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIT SEQ ID NO. 234	INTMG SEQ ID NO. 151	WYRQAPGKQRELVA SEQ ID NO. 234	ARDREGVINVDVSVKG SEQ ID NO. 171	RFTISRDNKNTVYLOMNLSL RPEDTAVYICHA SEQ ID NO. 244	GTQDRTGRNFDK SEQ ID NO. 191	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 245
054B12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIT SEQ ID NO. 89	INTMG SEQ ID NO. 151	WYRQAPGKQRELVA SEQ ID NO. 110	ARDREGVINVDVSVKG SEQ ID NO. 171	RFTISRDNKNTVYLOMNLSL RPEDTAVYICHA SEQ ID NO. 130	GTQDRTGRNFDK SEQ ID NO. 191	WGQGLTVTVSS SEQ ID NO. 131

[0537] 表35-序列优化的变体的Chotia CDR注释

[0538]

	HCDR1	HCDR2	HCDR3
CXCR20059	GSILTIN	TRGGS	DDRGGVY
CXCR20063	GSILTIN	TRGGS	DDRGGVY
CXCR20061	GSIVRIN	TSGGN	EIVLVGVWTQRARTGNY
CXCR20079	GSTFDFK	RLSGN	NIRGQDY
CXCR20076	GRIFSSN	TWRS GGS	GGSSWLSFPPDY
CXCR20086	GRTFSDY	TWNGGR	DKDRRTDYLGHVPAY
CXCR20104	GSTFRIN	DRGGY	GTQDRTGRNFDR

[0539] 22. 表位绘图

[0540] 由Integral Molecular Inc., 3711 Market street, Suite 900, Philadelphia, PA, USA, www.integralmolecular.com, 使用其鸟枪法诱变技术进行纳米抗体的表位绘图。

[0541] 鸟枪法诱变技术概述

[0542] 鸟枪法诱变使用专利所有的高通量细胞表达技术, 所述技术能够在真核细胞中表达和分析大文库的经突变的靶蛋白。单独地突变蛋白质中的每一个残基, 通常突变为多种其他氨基酸, 从而测定功能的改变。在标准的哺乳动物细胞系中表达蛋白质, 因而甚至可以对需要真核细胞翻译或翻译后加工的困难的蛋白质进行绘图。

[0543] 表位绘图的命名如下:

[0544] RDHBC 792=CXCR20079

[0545] RDHBC 793=CXCR20061

[0546] RDHBC 792=CXCR20076

[0547] 以单个氨基酸的解析度, 如下使用鸟枪法诱变, 绘制抗CXCR2抗体RD-HBC792 (CXCR20079)、RD-HBC793 (CXCR20061) 和RD-HBC794 (CXCR20076) 的表位。

[0548] 亲代构建体: 将未标记的亲代基因克隆到高表达载体中, 测序并通过免疫检测验证表达。纳米抗体优化: 通过在384孔微板中测定纳米抗体稀释物的组, 在鸟枪法诱变模式中优化纳米抗体的检测。选择每个纳米抗体的最佳浓度, 用于筛选突变文库。完成突变文库, 将每个氨基酸位置到突变为保守的和保守的改变, 包括将每个残基突变为Ala取代。测试文库的表面表达, 并通过免疫检测以一式三份筛选纳米抗体结合。对文库实施失去纳米抗体结合的分析, 鉴别和绘制关键的残基。

[0549] 通过免疫发光和免疫荧光, 在384孔模式下, 进行瞬时表达的野生型亲代构建体的亲代构建体表达免疫检测。对于所有的实验, 使用液体操作机器人, 实施在细胞转染和免疫染色中涉及的液体操作步骤, 确保精确度和高的实验可重复性。

[0550]

实验参数	免疫发光	免疫荧光
细胞	HEK-293T	HEK-293T
固定剂	4%PFA	4%PFA
封闭缓冲液	10%山羊血清	10%山羊血清
1°Mab靶 浓度 孵育生产商 货号#	α -CXCR2 2ug/ml 1小时 R&D Systems MAB331	α -CXCR2 3 ug/ml 1 小时 R&D Systems MAB331
2°Mab靶 浓度 孵育生产商 货号#	α -小鼠HRP 0.8 ug/ml Jackson Immunoresearch 115-035-003	α -小鼠Dyelight 549 3.75 ug/ml Jackson Immunoresearch 115-505-003
洗涤	PBS++	PBS++
信号: 背景	29: 1	2.2: 1
亲代的%CV	4.7%	12%

[0551] 表36. 用于测试亲代质粒的实验参数

[0552]

使用多克隆血清检测总受体细胞表面表达。使用多克隆血清(能够与所有突变体反应)定量总表达, 使得可以检测突变文库中的每个克隆。实验参数	多克隆免疫检测
细胞	HEK-293T

[0553]

固定剂	4%PFA
封闭缓冲液	10%山羊血清
1°PAb靶 浓度 孵育生 产商 货号#	α -CXCR2 1:1,000稀释 1 小时 Novus NBP1-49218
2°Mab靶 浓度 孵育 生产商 货号#	α -兔HRP 0.8 ug/ml Southern Biotech 4050-05
洗涤	PBS++
信号: 背景	17: 1
%CV	10%

[0554] 表37用于多克隆免疫检测的实验参数

[0555] 总结:使用对照Mab和多克隆血清,检测到了野生型亲代构建体的强的表面表达和总表达,因而野生型亲代构建体可以用于鸟枪法诱变。免疫发光测定显示了高的信号:背景和低的变异性,并将用于绘图研究。

[0556] 使用绘图的纳米抗体优化免疫检测。在384孔模式下完成免疫检测,使用瞬时转染了野生型受体或仅载体的质粒的细胞。基于具有最大信号:背景和低变异性的近最大信号,选择用于进一步绘图研究的浓度。

[0557] 用于筛选突变文库的最终测定条件

[0558]

实验参数	RD-HBC792	RD-HBC793	RD-HBC794
细胞	HEK-293T	HEK-293T	HEK-293T
固定剂	4%PFA	4%PFA	4%PFA
封闭缓冲液	10%山羊血清	10%山羊血清	10%山羊血清
1°Mab 靶 最佳浓度 孵育	α -CXCR2 1.0 ug/ml 1 小时	α -CXCR2 1.0 ug/ml 1 小时	α -CXCR2 2.0 ug/ml 1 小时
2°Mab			

[0559]

靶浓度	α-myc 2 ug/ml	α-myc 2 ug/ml	α-myc 2 ug/ml
孵育	1 小时	1 小时	1 小时
生产商	内部	内部	内部
抗体名称	杂交瘤 9E10	杂交瘤 9E10	杂交瘤 9E10
3°MAb			
靶浓度	α-小鼠 HRP	α-小鼠 HRP	α-小鼠 HRP
	0.8 ug/ml	0.8 ug/ml	0.8 ug/ml
生产商	Jackson	Jackson	Jackson
货号 #	Immunoresearch	Immunoresearch	Immunoresearch
	115-035-003	115-035-003	115-035-003
洗涤	PBS++	PBS++	PBS++
信号: 背景	13: 1	6.9: 1	20: 1
%CV	7.9%	22%	13%

[0560] 表38. 用于在鸟枪法诱变384孔模式中优化的测定检测的实验参数。使用本文定义的优化的测定条件, 用于绘制384孔模式中的CXCR2突变文库。通过瞬时转染在细胞中表达文库中的每个克隆, 并在转染后约18小时, 测定每个克隆的纳米抗体的反应性。CXCR2纳米抗体RD-HBC792、RDHBC793和RD-HBC794缺少Fc区, 但含有myc-标签, 因此使用其中应用了中间小鼠抗myc抗体(9E10)的多步检测对策, 随后用抗小鼠HRP抗体进行检测。

[0561] 结论: 确定了用于3种CXCR2纳米抗体的免疫检测和表位绘图的最佳条件。优化的条件导致在鸟枪法诱变模式中的高信号: 背景和低变异, 因此可以高可信度用于表位绘图。表位绘图涉及应用本文确定的相同的测定条件, 但使用受体变体的突变文库。

[0562] 鉴别纳米抗体表位的关键残基

[0563]

残基 ID	突变	克隆 ID	多克隆		RD HBC 792		RD HBC 793		RD HBC 794	
			平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差
11	F11A	10	39.9	17.0	7.1	2.1	81.1	13.7	81.6	20.6
	F11Y	975	70.5	6.2	26.7	14.7	113.9	5.4	100.2	29.1
14	F14A	486	35.4	5.4	9.4	3.9	98.6	8.7	110.3	5.5
	F14Y	1170	100.2	16.7	53.0	10.0	117.7	46.6	124.9	4.6
15	W15A	116	69.2	2.8	6.4	1.4	125.4	18.6	114.5	13.1
	W15Y	1075	92.3	6.2	14.9	6.4	112.2	27.9	110.8	11.4
39	C39A	95	86.2	6.0	65.0	6.7		7.1		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
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

[0564] 表39. 鉴别关键残基。通过比较克隆的纳米抗体反应性与多克隆的反应性(表面表达)鉴别Mab的关键残基。抗体表位中涉及的残基被鉴别为对于纳米抗体结合是阴性的,而对于多克隆结合是阳性的残基,包括A1a残基取代(即,去除了残基的侧链),并位于胞外环中。显示了Mab结合和多克隆抗体结合的平均反应性和标准差。对于每个Mab鉴别的关键残基是灰色阴影的。还比较了RD HBC792和RD HBC793的数据,因为发现RD HBC792的结合谱与商业的多克隆血清(源自人CXCR2的N末端胞外结构域,很可能解释了针对F11、F14和W15突变的降低的血清反应性)相似。

[0565] 表位信息的其他分析

[0566] 通过鸟枪法诱变绘图鉴别的关键氨基酸定义了3种CXCR2Mab的结合位点。Mab RD HBC792绘制在CXCR2的N末端区域,并且关键残基紧密相邻提示表位本质上是线性的。Mab RD HBC793和RD HBC794表现出结合构象上复杂的表位,所述表位主要由CXCR2的ECL1和ECL3形成。已知形成保持趋化因子受体中的胞外环位置的2个二硫桥的胞外Cys残基的突变也消除了Mab 793和794的结合,因而不认为直接参与了表位相互作用。793和794的表位显著重叠,尽管两者之间明显存在细微的差异。

[0567] 23. 重组细胞系中CXCR2选择性

[0568] 激动剂诱导的细胞内钙释放 (FLIPR)

[0569] 为了检查CXCR2选择性,将不同的单价抗CXCR2纳米抗体组合为单价、二价或双互补位构建体,其中单个纳米抗体构件被35GS接头分隔开。

[0570] 在37℃用Fluo-4染料装载表达人CXCR2受体的RBL细胞30分钟,然后用经纯化的单价、二价或双互补位纳米抗体孵育30分钟。最后,使用荧光测定成像平板阅读器 (FLIPR) 进行GRO α 的添加,随后检测荧光信号,对应于细胞内钙释放。使用表达人CXCR1的L2071细胞进行选择测定法。测定法方法仍然与对于CXCR2描述的相同,然而,使用IL-8作为激动剂。在图3中显示了代表性的结果。

[0571] 24. 使用抗HSA (A1b8) 的半寿期延长

[0572] 嗜中性粒细胞是炎症中的主要促炎性细胞之一,表达高水平的CXCR2受体,所述CXCR2介导化学趋向性。可以通过流式细胞术定量使用CXCR2配体 (GRO α) 或对照刺激物 (FMLP) 刺激后嗜中性粒细胞形状改变并用作激活标志物。

[0573] 在此研究中,体内描述抗CXCR2纳米抗体以测定半寿期延长的纳米抗体 (HLE: CXCR20076-35GS-CXCR20079-A1b8 (在实施例中也称为76-79-A1b8)) 较之NB-NB (非-HLE: CXCR20076-35GS-CXCR20079 (在实施例中也称为76-79)) 的药物动力学特征。以等摩尔剂量将单次剂量的纳米抗体静脉内注射到食蟹猴中:非格式化的纳米抗体 (NB-NB, 0.3mg/kg) 或由A1b8 (抗HSA) 结构域延长的纳米抗体 (NB-NB-A1b8, 0.45mg/kg), 在给药前,和给药后多至35天的多个时间点收集血液。在第一个采样时间点 (注射后1h或3h) 所有构建体离体完全抑制了全血嗜中性粒细胞形状改变 (WBSC)。与NB-NB非-HLE纳米抗体的30小时相比,对于NB-NB-A1b8融合物的9天的较长的持续时间证明了强的PD抑制 (WBSC)。

[0574] 25. 纳米抗体79-76-A1b8和79-86-A1b8完全阻断CXCR2功能活性

[0575]

NVP	对 GRO α 的 IC ₅₀ (nM)			
	CHO-hCXC R2 GTPyS	分离的 hSCA	hWBSCA	NHP WBSC
	平均值 $\pm$ SD N = 3	平均值 $\pm$ SEM N = 3	平均值 $\pm$ SEM N = 6-12	平均值 $\pm$ SEM N = 4
(79-76-A1b8)	2.86 $\pm$ 0.11	0.26 $\pm$ 0.04	0.11 $\pm$ 0.00	0.76 $\pm$ 0.25
(79-86-A1b8)	2.03 (n=1)	0.16 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.	0.6 $\pm$ 0.5 (SD n =3)

[0576] 纳米抗体79-76-A1b8-AA和79-86-A1b8-AA是功能等同的并且完全阻断CXCR2功能。因此抗体未被在C末端添加Ala-Ala变体改变。

[0577]

NVP	对 GRO α 的 IC ₅₀ (nM)			
	CHO-hCXC R2 GTPyS	分离的 hSCA	hWBSCA	NHP WBSC
	平均值 $\pm$ SD N = 3	平均值 $\pm$ SEM N = 3	平均值 $\pm$ SEM N = 6-8	平均值 $\pm$ SEM N = 4
(79-76-Alb8-AA)	1.31 $\pm$ 0.41	0.25 $\pm$ 0.06	0.15 $\pm$ 0.01	1.36 $\pm$ 0.7
(79-86-Alb8-AA)	2.63 $\pm$ 1.74	0.26 $\pm$ 0.06	0.19 $\pm$ 0.02	0.72 $\pm$ 0.2)

[0578] 26. 检测在健康志愿者中与CXCR2纳米抗体相互作用的IgG抗体和C末端延伸的效果

[0579] 在夹心ELISA中通过筛选健康供体血清(44名男性和44名女性)评价人血清中与CXCR20079-35GS-CXCR20076(79-76), CXCR20079-35GS-CXCR20076-ALB8(79-76-Alb8) CXCR20079-35GS-CXCR20086(79-86)和CXCR20079-35GS-CXCR20086-ALB8(79-86-Alb8)结合的IgG抗体的形成。简而言之,将纳米抗体CXCR20079-35GS-CXCR20076-ALB8直接固定在微滴度板上。抗纳米抗体抗体被固定化的纳米抗体捕获并且被与辣根过氧化物酶偶联的抗人IgG-(Fc特异性)抗体检测。在用底物TMB孵育后,在450nm处测量酶促反应的有色产物的光密度(OD)。使用的阳性对照抗体是人抗CXCR2抗体NOV0205(1M8)(通过噬菌体展示内部生成),批次ACE00277。估计初步截断点因为并未验证测定法,平均值归一化的OD(OD样品/OD阴性对照)

[0580] 测试了44名男性和44名女性健康供体血清,其中50%的男性和61%的女性样品表现出高于测定法的初步筛选截断点的与亲代纳米抗体的反应性(见下图)。

[0581] 不受任何解释、机制或假说的限制,证据提示IgG与人源化的Vh结构域中的构象表位,通常在抗体中被CH1结构域遮蔽的区域相互作用。为了阻断此相互作用,生成多个C末端延伸(A、AA、AS、AST、ASTKP、GGGS)并测试抗Nb IgG和功能活性。下图中显示的数据显示具有AA C末端延伸的双互补位半寿期延长的纳米抗体79-76-Alb8-AA显著降低了抗Nb IgG反应性,在男性中从50%降低至20%并在女性中从61%降低至16%。此外,较之不具有C末端延伸的纳米抗体79-76-Alb8和79-86-Alb8,Ala-Ala C末端变体79-76-Alb8-AA和79-86-Alb8-AA未改变功能活性,见图4。

[0582] 27. 使用CXCR2的双互补位纳米抗体抑制趋化性

[0583] 趋化性是细胞沿着化学品浓度梯度的定向移动。在体内这与吞噬细胞的迁移相关,诸如嗜中性粒细胞经由内皮细胞从血管迁移至组织。参考见Boyden S(1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. J Exp Med;115:453-466和Frevort C, Wong V, Goodman R, 等人(1998) Rapid fluorescence-based measurement of neutrophil migration in vitro. J Immunol Methods;213(1):41-52。

[0584] 为了体外模拟此过程我们开发了transwell测定法,使用来自Becton Dickinson的3 μ m聚酯膜。简而言之,将EC₅₀浓度的趋化因子(2nM rhGRO- α)添加至接受盘的底孔,然后将多孔插入物降入到位置。从外周血新鲜分离并且用活力染料,钙黄绿素-AM标记的人嗜中性粒细胞在室温用不同浓度的纳米抗体(0.007-30nM)预孵育30分钟。然后将细胞添加至多孔插入物并在37℃孵育90分钟,然后移出并丢弃插入物。然后在BioTek Synergy平板阅读器上以485nm激发和520nm发射测量来自已经迁移到接受盘的孔中的细胞的荧光。抗CXCR2纳米抗体,79-76-A1b8-AA,抑制rhGRO- α 刺激的趋化性,IC₅₀值为0.256 $\pm$ 0.02nM(平均值 $\pm$ SEM,来自n=4个供体),见图5。

序列表

<110> 诺华股份有限公司

<120> 趋化因子受体结合多肽

<130> PAT055116

<160> 248

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 360

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Glu Asp Phe Asn Met Glu Ser Asp Ser Phe Glu Asp Phe Trp Lys
1 5 10 15

Gly Glu Asp Leu Ser Asn Tyr Ser Tyr Ser Ser Thr Leu Pro Pro Phe
20 25 30

Leu Leu Asp Ala Ala Pro Cys Glu Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys
35 40 45

Tyr Phe Val Val Ile Ile Tyr Ala Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Leu
50 55 60

[0001]

Gly Asn Ser Leu Val Met Leu Val Ile Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg
65 70 75 80

Ser Val Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu
85 90 95

Phe Ala Leu Thr Leu Pro Ile Trp Ala Ala Ser Lys Val Asn Gly Trp
100 105 110

Ile Phe Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu Lys Glu Val
115 120 125

Asn Phe Tyr Ser Gly Ile Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ser Val Asp Arg
130 135 140

Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg Tyr
145 150 155 160

Leu Val Lys Phe Ile Cys Leu Ser Ile Trp Gly Leu Ser Leu Leu Leu
165 170 175

Ala Leu Pro Val Leu Leu Phe Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val
180 185 190

Ser Pro Ala Cys Tyr Glu Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Asn Trp Arg
195 200 205

Met Leu Leu Arg Ile Leu Pro Gln Ser Phe Gly Phe Ile Val Pro Leu
210 215 220

Leu Ile Met Leu Phe Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys
 225 230 235 240
 Ala His Met Gly Gln Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala Val
 245 250 255
 Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Asn Leu Val Leu Leu
 260 265 270
 Ala Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg
 275 280 285
 Arg Asn His Ile Asp Arg Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Leu His Ser Cys Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys
 305 310 315 320
 Phe Arg His Gly Leu Leu Lys Ile Leu Ala Ile His Gly Leu Ile Ser
 325 330 335
 Lys Asp Ser Leu Pro Lys Asp Ser Arg Pro Ser Phe Val Gly Ser Ser
 340 345 350
 Ser Gly His Thr Ser Thr Thr Leu
 355 360

[0002]

<210> 2
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2

Met Glu Asp Leu Ser Asn Tyr Ser Tyr Ser Ser Thr Leu Pro Pro Phe
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Ala Ala Pro Cys Glu Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys
 20 25 30
 Tyr Phe Val Val Ile Ile Tyr Ala Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Leu
 35 40 45
 Gly Asn Ser Leu Val Met Leu Val Ile Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg
 50 55 60
 Ser Val Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu
 65 70 75 80
 Phe Ala Leu Thr Leu Pro Ile Trp Ala Ala Ser Lys Val Asn Gly Trp
 85 90 95
 Ile Phe Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu Lys Glu Val
 100 105 110
 Asn Phe Tyr Ser Gly Ile Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ser Val Asp Arg
 115 120 125

Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg Tyr
 130 135 140
 Leu Val Lys Phe Ile Cys Leu Ser Ile Trp Gly Leu Ser Leu Leu Leu
 145 150 155 160
 Ala Leu Pro Val Leu Leu Phe Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val
 165 170 175
 Ser Pro Ala Cys Tyr Glu Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Asn Trp Arg
 180 185 190
 Met Leu Leu Arg Ile Leu Pro Gln Ser Phe Gly Phe Ile Val Pro Leu
 195 200 205
 Leu Ile Met Leu Phe Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys
 210 215 220
 Ala His Met Gly Gln Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala Val
 225 230 235 240
 Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Asn Leu Val Leu Leu
 245 250 255
 Ala Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg
 260 265 270
 [0003] Arg Asn His Ile Asp Arg Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Ile
 275 280 285
 Leu His Ser Cys Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys
 290 295 300
 Phe Arg His Gly Leu Leu Lys Ile Leu Ala Ile His Gly Leu Ile Ser
 305 310 315 320
 Lys Asp Ser Leu Pro Lys Asp Ser Arg Pro Ser Phe Val Gly Ser Ser
 325 330 335
 Ser Gly His Thr Ser Thr Thr Leu
 340
 <210> 3
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴
 <400> 3
 Met Gln Ser Phe Asn Phe Glu Asp Phe Trp Glu Asn Glu Asp Phe Ser
 1 5 10 15
 Asn Tyr Ser Tyr Ser Ser Asp Leu Pro Pro Ser Leu Pro Asp Val Ala
 20 25 30
 Pro Cys Arg Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys Tyr Phe Val Val Ile
 35 40 45

[0004]

```

Ile Tyr Ala Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Leu Gly Asn Ser Leu Val
 50          55          60

Met Leu Val Ile Leu His Ser Arg Val Gly Arg Ser Ile Thr Asp Val
 65          70          75          80

Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Met Ala Asp Leu Leu Phe Ala Leu Thr Leu
      85          90          95

Pro Ile Trp Ala Ala Ala Lys Val Asn Gly Trp Ile Phe Gly Thr Phe
    100          105          110

Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu Lys Glu Val Asn Phe Tyr Ser Gly
    115          120          125

Ile Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val
    130          135          140

His Ala Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg Tyr Leu Val Lys Phe Val
    145          150          155          160

Cys Leu Ser Ile Trp Ser Leu Ser Leu Leu Ala Leu Pro Val Leu
      165          170          175

Leu Phe Arg Arg Thr Val Tyr Leu Thr Tyr Ile Ser Pro Val Cys Tyr
    180          185          190

Glu Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Lys Trp Arg Met Val Leu Arg Ile
    195          200          205

Leu Pro Gln Thr Phe Gly Phe Ile Leu Pro Leu Leu Ile Met Leu Phe
    210          215          220

Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys Ala His Met Gly Gln
    225          230          235          240

Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala Val Val Leu Ile Phe Leu
    245          250          255

Leu Cys Trp Leu Pro Tyr His Leu Val Leu Leu Ala Asp Thr Leu Met
    260          265          270

Arg Thr Arg Leu Ile Asn Glu Thr Cys Gln Arg Arg Asn Asn Ile Asp
    275          280          285

Gln Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Ile Leu His Ser Cys Leu
    290          295          300

Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys Phe Arg His Gly Leu
    305          310          315          320

Leu Lys Ile Leu Ala Thr His Gly Leu Ile Ser Lys Asp Ser Leu Pro
    325          330          335

Lys Asp Ser Arg Pro Ser Phe Val Gly Ser Ser Ser Gly His Thr Ser
    340          345          350

```

Thr Thr Leu
355

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> 食蟹猴

<400> 4

Met Gln Ser Phe Asn Phe Glu Asp Phe Trp Glu Asn Glu Asp
1 5 10

<210> 5
<211> 18
<212> PRT
<213> 食蟹猴

<400> 5

Cys Thr Leu Met Arg Thr Arg Leu Ile Asn Glu Thr Leu Gln Arg Arg
1 5 10 15

Asn Cys

<210> 6
<211> 26
<212> PRT
<213> 食蟹猴

<400> 6

[0005]

Cys Arg Arg Thr Val Tyr Leu Thr Tyr Ile Ser Pro Val Leu Tyr Glu
1 5 10 15

Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Leu Trp Cys
20 25

<210> 7
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

Met Glu Asp Phe Asn Met Glu Ser Asp Ser Phe Glu Asp Phe Trp Lys
1 5 10 15

Gly Glu Asp

<210> 8
<211> 31
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

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

Leu Asp Ala Ala Pro Cys Glu Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys
20 25 30

<210> 9
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 9

Phe Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val Ser Pro Ala Cys Tyr Glu
 1 5 10 15

Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Asn Trp Arg
 20 25

<210> 10
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 10

Cys Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val Ser Pro Ala Leu Tyr Glu
 1 5 10 15

Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Asn Trp Cys
 20 25

<210> 11
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 11

[0006]

Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg Arg
 1 5 10 15

Asn His

<210> 12
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 12

Cys Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Leu Glu Arg Arg
 1 5 10 15

Asn Cys

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 13
 ggctgagctg ggtggtcctg g

21

<210> 14
 <211> 21

[0007]	<212>	DNA		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	引物		
	<400>	14		
		ggctgagttt ggtggtcctg g	21	
	<210>	15		
	<211>	23		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	引物		
	<400>	15		
		ggtacgtgct gttgaactgt tcc	23	
	<210>	16		
	<211>	55		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	引物		
	<400>	16		
		catttgagtt ggccctagccg gccatggcag aggtgcagct ggtggagtct ggggg	55	
[0007]	<210>	17		
	<211>	18		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	引物		
	<400>	17		
		tgtaaaacga cggccagt	18	
	<210>	18		
	<211>	18		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	引物		
	<400>	18		
		caggaaacag ctatgacc	18	
	<210>	19		
	<211>	88		
	<212>	DNA		
	<213>	人工序列		
	<220>			
	<223>	引物		
	<400>	19		
		tcagtaacct ggatcccccg ccaccgctgc ctccaccgcc gctacccccg ccaccgctgc	60	
		ciccaccgcc tgaggagacg gtgacctg	88	
	<210>	20		
	<211>	84		
	<212>	DNA		

[0008]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 20	
	aggttactga ggaatccggcg gtggaggcag cggaggtagg ggctctggtg gcgggggtag	60
	cgaggtagcag ctggtaggagt ctgg	84
	<210> 21	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 21	
	gaggtgcaat tggtaggagtc tggg	24
	<210> 22	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 22	
	tgaggagacg gtgacctggg tccc	24
	<210> 23	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 23	
	tcttggatcc gaggtgcagc tggtaggagtc tggg	34
	<210> 24	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 24	
	accgcctccg gaggagaccg tgacctgggt ccc	33
	<210> 25	
	<211> 119	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 单价抗CXCR2纳米抗体	
	<400> 25	
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
	1 5 10 15	
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr	
	20 25 30	

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

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

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

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

Ala Thr Val Arg Gly Thr Ala Arg Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 26
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 单价抗CXCR2纳米抗体

<400> 26

[0009]

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

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

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

Ala Val Ser Arg Ser Gly Gly Ser Thr Asp Ile Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Ala His Thr Ser Ser Tyr Ser Asn Trp Arg Val Tyr Asn Asn Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 27
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 单价抗CXCR2纳米抗体

<400> 27

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

Ser Leu Arg Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Gly Thr Ile Asn
20 25 30

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

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

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

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

Val Glu Thr Val Val Gly Ala Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 28

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

[0010]

<220>

<223> 单价抗CXCR2纳米抗体

<400> 28

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Met Gly Asn Ile Asn
20 25 30

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

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

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

Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Tyr Asn
85 90 95

Val Asp Gly Gly Pro Ser Gln Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 29
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 单价抗CXCR2纳米抗体

<400> 29

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

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

Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
 35 40 45

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

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

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

Ala Ala Tyr Trp Gly Leu Thr Leu Arg Leu Trp Met Pro Pro His Arg
 100 105 110

[0011]

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

<210> 30
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 单价抗CXCR2纳米抗体

<400> 30

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

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

Gly Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gln Arg Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Leu Thr Lys Asp Gly Thr Leu His Tyr Ala Asp Pro Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Glu Asn Thr Trp Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Asn

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

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

Ala Ala Ser Arg Thr Asn Pro Lys Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 单价抗CXCR2纳米抗体

<400> 33

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

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

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

[0013]

Ala Gly Ile Ser Trp Gly Gly Asp Asn Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Arg Tyr Arg Gly Gly Ala Ala Val Ala Gly Trp Glu Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 单价抗CXCR2纳米抗体

<400> 34

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

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

Thr Val Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Asp Arg Arg Thr Asp Cys Lys Lys Gly Arg Val Gly Ser Gly
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 单价抗CXCR2纳米抗体

<400> 35

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

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

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

Ala Ala Ile Ser Thr Arg Gly Ser Met Thr Lys Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu His Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Asp Pro Arg Gly Ser Ser Trp Ser Phe Ser Ser Gly Gly Tyr
100 105 110

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

<210> 36
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 单价抗CXCR2纳米抗体

[0014]

<400> 36

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

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

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

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

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

His Met Asp Met Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Gly Lys Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 37

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 单价抗CXCR2纳米抗体

[0015]

<400> 37

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

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

Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val
35 40 45

Ala Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Met His Tyr Ala Glu Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 38

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 单价抗CXCR2纳米抗体

<400> 38

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp His Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0016]

<210> 39

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 单价抗CXCR2纳米抗体

<400> 39

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg Ile Asn
20 25 30

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

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

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

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

Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala Arg Thr
100 105 110

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

<210> 40
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 单价抗CXCR2纳米抗体

<400> 40

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

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

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

Ala Ala Leu Thr Arg Asn Gly Gly Tyr Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

[0017]

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

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

<210> 41
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 单价抗CXCR2纳米抗体

<400> 41

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

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

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

Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala	100	105	110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser	115	120	
<210> 42			
<211> 122			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 单价抗CXCR2纳米抗体			
<400> 42			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ser Asn	20	25	30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val	35	40	45
Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser	50	55	60
Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val	65	70	75
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	85	90	95
Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp	100	105	110
Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser	115	120	
<210> 43			
<211> 115			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 单价抗CXCR2纳米抗体			
<400> 43			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly Gly	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn	20	25	30

[0018]

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Met
 85 90 95
 Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115
 <210> 44
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 多价抗CXCR2纳米抗体
 <400> 44
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg Ile Asn
 20 25 30
 Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Asp Ile Thr Ser Gly Gly Asn Ile Asn Tyr Ile Asp Ala Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 85 90 95
 Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala Arg Thr
 100 105 110
 Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 130 135 140
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

[0019]

	165	170	175
	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val 180	Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg Ile 185	
	Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu 195	200	205
	Val Ala Asp Ile Thr Ser Gly Gly Asn Ile Asn Tyr Ile Asp Ala Val 210	215	220
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Thr Val Tyr 225	230	235 240
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 245	250	255
	Asn Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala Arg 260	265	270
	Thr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser 275	280	285
	<210> 45 <211> 257 <212> PRT <213> 人工序列		
[0020]	<220> <223> 多价抗CXCR2纳米抗体		
	<400> 45		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15		
	Ser Val Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Ile Phe Arg Leu Ser 20 25 30		
	Ala Leu Gly Trp Thr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Ala Arg Glu Trp Val 35 40 45		
	Ala Gly Ile Asn Ser Asp Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys 50 55 60		
	Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu 65 70 75 80		
	His Met Asp Met Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala 85 90 95		
	Ser Gly Lys Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly 100 105 110		
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly 115 120 125		
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly 130 135 140		

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 145 150 155 160
 Gly Gly Ser Val Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Ile Phe Arg
 165 170 175
 Leu Ser Ala Leu Gly Trp Thr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Ala Arg Glu
 180 185 190
 Trp Val Ala Gly Ile Asn Ser Asp Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Pro
 195 200 205
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ile
 210 215 220
 Tyr Leu His Met Asp Met Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 225 230 235 240
 Cys Ala Ser Gly Lys Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 245 250 255

Ser

[0021]

<210> 46
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列
 <400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Met
 85 90 95
 Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly
 165 170 175
 Ser Ile Val Arg Ile Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly
 180 185 190
 Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Asp Ile Thr Ser Gly Gly Asn Ile Asn
 195 200 205
 Tyr Ile Asp Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr
 210 215 220
 Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 225 230 235 240
 Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp
 245 250 255
 Thr Gln Arg Ala Arg Thr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
 260 265 270

[0022]

Thr Val Ser Ser
275

<210> 47

<211> 276

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列

<400> 47

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg Ile Asn
20 25 30

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

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

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

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

Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala Arg Thr
100 105 110

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly
165 170 175

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile
180 185 190

Asn Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu
195 200 205

Val Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val
210 215 220

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met Tyr
225 230 235 240

[0023]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
245 250 255

Met Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
260 265 270

Thr Val Ser Ser
275

<210> 48

<211> 261

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列

<400> 48

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn
20 25 30

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

Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met Tyr Leu

[0024]

65	70	75	80
Gln Met Asn Ser	Leu Lys Pro Glu Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr	Cys Met
	85	90	95
Leu Asp Asp Arg	Gly Gly Val Tyr Trp Gly	Gln Gly Thr Gln	Val Thr
	100	105	110
Val Ser Ser Gly	Gly Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Ser Gly	Gly Gly
	115	120	125
Gly Ser Gly Gly	Gly Gly Ser Gly	Gly Gly Gly Gly	
	130	135	140
Ser Gly Gly Gly	Gly Ser Glu Val Gln	Leu Val Glu Ser	Gly Gly Gly
	145	150	155
Leu Val Gln Pro	Gly Gly Ser Val Arg	Leu Ser Cys Val	Ala Ser Gly
	165	170	175
Ile Ile Phe Arg	Leu Ser Ala Leu Gly	Trp Thr Arg Gln	Gly Pro Gly
	180	185	190
Lys Ala Arg Glu	Trp Val Ala Gly	Ile Asn Ser Asp	Gly Thr Thr Asn
	195	200	205
Tyr Ala Asp Pro	Val Lys Gly Arg	Phe Thr Ile Ser	Arg Asp Asn Ala
	210	215	220
Lys Asn Thr Ile	Tyr Leu His Met	Asp Met Leu Lys	Pro Glu Asp Thr
	225	230	235
Ala Val Tyr Tyr	Cys Ala Ser Gly	Lys Tyr Arg Gly	Gln Gly Thr Gln
	245	250	255
Val Thr Val Ser	Ser		
	260		
<210>	49		
<211>	261		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	多价抗CXCR2纳米抗体的序列		
<400>	49		
Glu Val Gln Leu	Val Glu Ser Gly	Gly Gly Leu Val	Gln Pro Gly Gly
1	5	10	15
Ser Val Arg Leu	Ser Cys Val Ala	Ser Gly Ile Ile	Phe Arg Leu Ser
	20	25	30
Ala Leu Gly Trp	Thr Arg Gln Gly	Pro Gly Lys Ala	Arg Glu Trp Val
	35	40	45
Ala Gly Ile Asn	Ser Asp Gly Thr	Thr Asn Tyr Ala	Asp Pro Val Lys
	50	55	60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu
 65 70 75 80
 His Met Asp Met Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Ser Gly Lys Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 130 135 140
 Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro
 145 150 155 160
 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr
 165 170 175
 Ile Asn Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu
 180 185 190
 Leu Val Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser
 195 200 205
 [0025] Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met
 210 215 220
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 225 230 235 240
 Cys Met Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 245 250 255
 Val Thr Val Ser Ser
 260
 <210> 50
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列
 <400> 50
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg Ile Asn
 20 25 30
 Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45

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

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

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

Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala Arg Thr
100 105 110

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
165 170 175

Gly Ser Val Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Ile Phe Arg Leu
180 185 190

[0026]

Ser Ala Leu Gly Trp Thr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Ala Arg Glu Trp
195 200 205

Val Ala Gly Ile Asn Ser Asp Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val
210 215 220

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ile Tyr
225 230 235 240

Leu His Met Asp Met Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
245 250 255

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

<210> 51

<211> 272

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列

<400> 51

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

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

Ala Leu Gly Trp Thr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Ala Arg Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Asn Ser Asp Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu
 65 70 75 80
 His Met Asp Met Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Ser Gly Lys Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 130 135 140
 Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 145 150 155 160
 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg
 165 170 175
 [0027] Ile Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gln Arg Glu
 180 185 190
 Leu Val Ala Asp Ile Thr Ser Gly Gly Asn Ile Asn Tyr Ile Asp Ala
 195 200 205
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Thr Val
 210 215 220
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 225 230 235 240
 Cys Asn Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala
 245 250 255
 Arg Thr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 260 265 270
 <210> 52
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列
 <400> 52
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn

[0028]

	20	25	30
Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val	35	40	45
Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys	50	55	60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met Tyr Leu	65	70	75
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Met	85	90	95
Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr	100	105	110
Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu	115	120	125
Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu	130	135	140
Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn Ala Met Gly Trp	145	150	155
Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Val Arg Arg Thr	165	170	175
Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr	180	185	190
Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser	195	200	205
Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Met Leu Asp Asp Arg	210	215	220
Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser	225	230	235
<210> 53			
<211> 274			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列			
<400> 53			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Glu	1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp Phe Lys	20	25	30
Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val	35	40	45

Ala Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Met His Tyr Ala Glu Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
145 150 155 160

Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
165 170 175

Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
180 185 190

[0029] Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val
195 200 205

Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
210 215 220

Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
225 230 235 240

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr
245 250 255

Leu Gly His Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
260 265 270

Ser Ser

<210> 54

<211> 272

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列

<400> 54

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

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

Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val
35 40 45

Ala Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Met His Tyr Ala Glu Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
145 150 155 160

[0030] Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly
165 170 175

Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
180 185 190

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser
195 200 205

Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
210 215 220

Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
225 230 235 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser
245 250 255

Phe Pro Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265 270

<210> 55

<211> 283

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列

<400> 55

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 [0031] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 145 150 155 160
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser
 165 170 175
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Ala
 180 185 190
 Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
 195 200 205
 Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys
 210 215 220
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu
 225 230 235 240
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 245 250 255
 Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala Tyr
 260 265 270
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 275 280
 <210> 56
 <211> 281
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列

<400> 56

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

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

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

Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala
100 105 110

[0032]

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145 150 155 160

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
165 170 175

Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala
180 185 190

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
195 200 205

Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala
210 215 220

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
225 230 235 240

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
245 250 255

Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp Gly
260 265 270

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 57

<211> 279

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列

<400> 57

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

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

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

Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser
50 55 60

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

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

[0033]

Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145 150 155 160

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
165 170 175

Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Gly
180 185 190

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile
195 200 205

Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly
210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
225 230 235 240

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala

	245	250	255
	Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
	260	265	270
	Thr Gln Val Thr Val Ser Ser		
	275		
	<210> 58		
	<211> 274		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列		
	<400> 58		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly		
	1	5	10
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr		
	20	25	30
	Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val		
	35	40	45
	Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val		
	50	55	60
[0034]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr		
	65	70	75
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
	Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala		
	100	105	110
	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly		
	115	120	125
	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
	130	135	140
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu		
	145	150	155
	Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Glu Ser		
	165	170	175
	Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp Phe Lys Val		
	180	185	190
	Met Gly Trp Tyr Arg Glu Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val Ala		
	195	200	205
	Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Met His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly		
	210	215	220

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
225 230 235 240

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Val
245 250 255

Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
260 265 270

Ser Ser

<210> 59

<211> 272

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列

<400> 59

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

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

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

[0035]

Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145 150 155 160

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Glu Ser Leu Arg
165 170 175

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp Phe Lys Val Met Gly
180 185 190

Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val Ala Ala Ile
195 200 205

Arg Leu Ser Gly Asn Met His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe
210 215 220

Thr Ile Ser Lys Ala Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
225 230 235 240

Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Val Asn Ile
245 250 255

Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
260 265 270

<210> 60

<211> 281

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列

<400> 60

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

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

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

Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
145 150 155 160

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg
165 170 175

[0036]

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Gly
180 185 190

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile
195 200 205

Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys Gly Arg
210 215 220

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu Gln Met
225 230 235 240

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp
245 250 255

Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala Tyr Trp Gly
260 265 270

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 61
<211> 281
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列

<400> 61

[0037]

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg Ile Asn
20 25 30

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

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

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

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

Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala Arg Thr
100 105 110

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

145	150	155	160
Ser Glu Val Gln	Leu Val Glu Ser Gly	Gly Gly Leu Val Gln	Ala Gly
	165	170	175
Gly Ser Leu Thr	Leu Ser Cys Ala	Val Ser Gly Ser Thr	Phe Arg Ile
	180	185	190
Asn Thr Met Gly Trp	Tyr Arg Arg Ala Pro Gly	Lys Gln Arg Glu Leu	
	195	200	205
Val Ala Ala Arg Asp	Arg Gly Gly Tyr Ile	Asn Tyr Val Asp Ser	Val
	210	215	220
Lys Gly Arg Phe Thr	Val Ser Arg Asp Asn	Ala Lys Pro Thr Met	Tyr
	225	230	235
Leu Gln Met Asn Ser	Leu Lys Pro Glu Asp	Thr Ala Val Tyr Tyr	Cys
	245	250	255
His Ala Gly Thr Gln	Asp Arg Thr Gly Arg	Asn Phe Asp Arg	Trp Gly
	260	265	270
Gln Gly Thr Gln	Val Thr Val Ser	Ser	
	275	280	

<210> 62
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列

<400> 62

Glu Val Gln	Leu Val Glu Ser Gly	Gly Gly Leu Val Gln	Pro Gly Gly
1	5	10	15
Ser Leu Arg	Leu Ser Cys Val Ala	Ser Gly Arg Ile Phe	Ser Ser Asn
	20	25	30
Ala Met Gly	Trp Phe Arg Gln Ala	Pro Gly Lys Glu Arg	Glu Phe Val
	35	40	45
Ala Ala Ile	Thr Trp Arg Ser Gly	Gly Ser Ala Tyr Tyr	Ala Asp Ser
	50	55	60
Ala Lys Gly	Arg Phe Thr Ile Ser	Arg Asp Asn Ala Lys	Asn Thr Val
	65	70	75
Tyr Leu Gln	Met Asn Ser Leu Lys	Pro Glu Asp Thr Ala	Val Tyr Tyr
	85	90	95
Cys Ala Ala	Gly Gly Ser Ser Trp	Leu Ser Phe Pro Pro	Asp Tyr Trp
	100	105	110
Gly Gln Gly	Thr Gln Val Thr	Val Ser Ser Gly	Gly Gly Ser Gly
	115	120	125

[0038]

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
 145 150 155 160
 Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Thr
 165 170 175
 Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ile Asn Thr Met Gly
 180 185 190
 Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala Arg
 195 200 205
 Asp Arg Gly Gly Tyr Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 210 215 220
 Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Pro Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn
 225 230 235 240
 Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Ala Gly Thr
 245 250 255
 Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 260 265 270

[0039]

Val Thr Val Ser Ser
275

<210> 63
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列

<400> 63

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

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

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

Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 145 150 155 160
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser
 165 170 175
 Leu Thr Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ile Asn Thr
 180 185 190
 Met Gly Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
 195 200 205
 Ala Arg Asp Arg Gly Gly Tyr Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly
 210 215 220
 Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Pro Thr Met Tyr Leu Gln
 225 230 235 240
 [0040] Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Ala
 245 250 255
 Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln Gly
 260 265 270
 Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 275
 <210> 64
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列
 <400> 64
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Met
 85 90 95
 Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Glu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly
 165 170 175
 Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
 180 185 190
 Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser
 195 200 205
 [0041] Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 210 215 220
 Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
 225 230 235 240
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser
 245 250 255
 Phe Pro Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 260 265 270
 <210> 65
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列
 <400> 65
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys

50	55	60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met Tyr Leu 65 70 75 80		
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Met 85 90 95		
Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr 100 105 110		
Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly 115 120 125		
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly 130 135 140		
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly 145 150 155 160		
Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly 165 170 175		
Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly 180 185 190		
Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val 195 200 205		
Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn 210 215 220		
Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp 225 230 235 240		
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr 245 250 255		
Leu Gly His Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val 260 265 270		
Ser Ser		
<210> 66		
<211> 272		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列		
<400> 66		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ser Asn 20 25 30		

[0042]

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60
 Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
 145 150 155 160
 Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 165 170 175
 [0043] Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn Ala Met Gly
 180 185 190
 Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Val Arg Arg
 195 200 205
 Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 210 215 220
 Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn
 225 230 235 240
 Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Met Leu Asp Asp
 245 250 255
 Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 260 265 270
 <210> 67
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列
 <400> 67
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	
				20					25					30			
	Ala	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val	
		35						40					45				
	Ala	Ala	Ile	Thr	Trp	Asn	Gly	Gly	Arg	Val	Phe	Tyr	Thr	Ala	Ser	Val	
		50					55						60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Met	Tyr	
	65					70					75				80		
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
	Ala	Ala	Asp	Lys	Asp	Arg	Arg	Thr	Asp	Tyr	Leu	Gly	His	Pro	Val	Ala	
				100					105					110			
	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
		115						120					125				
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
		130					135					140					
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	
	145					150				155						160	
[0044]	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Glu	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	
				165						170					175		
	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Ile	Leu	Thr	Ile	Asn	Ala	
				180					185						190		
	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Leu	Val	Val	
		195						200					205				
	Arg	Arg	Thr	Arg	Gly	Gly	Ser	Thr	Thr	Tyr	Gln	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	
		210					215					220					
	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Ile	Ala	Lys	Lys	Thr	Met	Tyr	Leu	Gln	
	225					230					235				240		
	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Leu	
				245						250					255		
	Asp	Asp	Arg	Gly	Gly	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	
				260					265					270			
	Ser	Ser															
	<210>	68															
	<211>	277															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列															
	<220>																

<223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列

<400> 68

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

[0045]

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
145 150 155 160

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
165 170 175

Cys Val Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Gly Trp Phe
180 185 190

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp
195 200 205

Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe
210 215 220

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
225 230 235 240

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Gly
245 250 255

Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
260 265 270

Val Thr Val Ser Ser
275

<210> 69
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 多价抗CXCR2纳米抗体的序列

<400> 69

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln
 100 105 110

[0046]

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
 145 150 155 160

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 165 170 175

Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Gly Trp Phe
 180 185 190

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp
 195 200 205

Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 210 215 220

Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 225 230 235 240

Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Lys Asp
 245 250 255

Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
260 265 270

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
275

<210> 70
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> fr1

<400> 70

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

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

<210> 71
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> fr1

<400> 71

[0047]

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

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

<210> 72
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR1

<400> 72

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

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

<210> 73
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR1

<400> 73

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

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

<210> 74
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FRI

<400> 74

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

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

<210> 75
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FRI

<400> 75

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

[0048]

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

<210> 76
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FRI

<400> 76

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

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

<210> 77
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FRI

<400> 77

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

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

<210> 78
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FRI

<400> 78

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

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

<210> 79
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FRI

<400> 79

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

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

[0049]

<210> 80
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FRI

<400> 80

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

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

<210> 81
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FRI

<400> 81

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

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

<210> 82

<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR1

<400> 82

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

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

<210> 83
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR1

<400> 83

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

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

[0050]

<210> 84
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR1

<400> 84

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

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

<210> 85
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR1

<400> 85

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

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

<210> 86
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> FR1

<400> 86

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

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

<210> 87

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR1

<400> 87

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

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

<210> 88

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

[0051]

<220>

<223> FR1

<400> 88

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

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

<210> 89

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR1

<400> 89

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

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

<210> 90

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 单价抗CXCR2纳米抗体

<400> 90

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0052]

<210> 91

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR2

<400> 91

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val Ser
1 5 10

<210> 92

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR2

<400> 92

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

<210> 93

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR2

<400> 93

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

<210> 94
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR2

<400> 94

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

<210> 95
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR2

<400> 95

Trp Phe Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 96
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR2

[0053]

<400> 96

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

<210> 97
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR2

<400> 97

Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Ile Ser
1 5 10

<210> 98
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR2

<400> 98

Trp Phe Arg Gln Ala Gln Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 99
<211> 14
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR2

<400> 99

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

<210> 100

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR2

<400> 100

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

<210> 101

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR2

<400> 101

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

[0054]

<210> 102

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR2

<400> 102

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

<210> 103

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR2

<400> 103

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

<210> 104

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR2

[0055]

<400> 104

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

<210> 105

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR2

<400> 105

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

<210> 106

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR2

<400> 106

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

<210> 107

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR2

<400> 107

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

<210> 108

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR2

<400> 108

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

<210> 109

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR2

<400> 109

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

<210> 110
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR2

<400> 110

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

<210> 111
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 111

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Asn Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 112
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

[0056]

<220>
<223> FR3

<400> 112

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 113
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 113

Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 114
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> FR3

<400> 114

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Glu Asn Thr Trp Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 115

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR3

<400> 115

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 116

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR3

<400> 116

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Ser Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 117

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR3

<400> 117

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 118

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR3

<400> 118

[0057]

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu His
1 5 10 15

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

<210> 119
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 119

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu His
1 5 10 15

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

<210> 120
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 120

[0058]

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 121
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 121

Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Pro Thr Met Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 122
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 122

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 123
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 123

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Val Ala Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 124
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 124

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu Gln
1 5 10 15

[0059]

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

<210> 125
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 125

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 126
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 126

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Met Leu

	20	25	30
<210>	127		
<211>	32		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	FR3		
<400>	127		
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln			
1 5 10 15			
Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Tyr Asn Val			
20 25 30			
<210>	128		
<211>	32		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	FR3		
<400>	128		
Arg Phe Thr Ile Ala Arg Asp Asn Ile Leu Asn Thr Ala Tyr Leu Gln			
1 5 10 15			
Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Tyr Asn Val			
20 25 30			
[0060]			
<210>	129		
<211>	32		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	FR3		
<400>	129		
Arg Phe Thr Ile Gly Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln			
1 5 10 15			
Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Tyr Asn Ile			
20 25 30			
<210>	130		
<211>	32		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	FR3		
<400>	130		
Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Pro Thr Met Tyr Leu Gln			
1 5 10 15			
Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Ala			
20 25 30			

<210> I31
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR4

<400> I31

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> I32
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR4

<400> I32

Arg	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> I33
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR4

[0061]

<400> I33

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> I34
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> I34

Asp	Tyr	Ala	Ile	Gly
1				5

<210> I35
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> I35

Leu	Ser	Gly	Met	Ala
1				5

<210> I36
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 136
Asn Tyr Ala Met Gly
I 5

<210> 137
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 137

Arg Ser Ala Met Gly
I 5

<210> 138
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 138

Tyr Tyr Thr Val Gly
I 5

[0062]

<210> 139
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 139

Tyr Tyr Val Met Ala
I 5

<210> 140
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 140

Leu Ser Ala Leu Gly
I 5

<210> 141
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 141

Phe Lys Val Met Gly
1 5

<210> 142
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 142

Ile Asn Thr Met Gly
1 5

<210> 143
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 143

Ile Asn Thr Met Gly
1 5

<210> 144
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

[0063]

<220>
<223> CDR1

<400> 144

Ser Leu Ser Met Gly
1 5

<210> 145
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 145

Asp Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 146
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 146

Ser Asn Ala Met Gly
1 5

<210> 147

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 147

Ile Asn Ala Met Gly
1 5

<210> 148
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 148

Ile Asn Ala Met Gly
1 5

<210> 149
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 149

[0064] Ile Asn Ala Met Gly
1 5

<210> 150
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 150

Ile Arg Ala Met Gly
1 5

<210> 151
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR1

<400> 151

Ile Asn Thr Met Gly
1 5

<210> 152
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 152

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

Gly

<210> 153

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 153

Val Ser Arg Ser Gly Gly Ser Thr Asp Ile Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 154

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 154

[0065]

Cys Ile Ser Gly Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 155

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 155

Val Leu Thr Lys Asp Gly Thr Leu His Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 156

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 156

Ala Ile Asn Lys Ser Gly Gly Asn Thr His Tyr Ala Gly Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 157
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 157

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

Gly

<210> 158
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 158

Cys Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

[0066]

<210> 159
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 159

Ala Ile Ser Thr Arg Gly Ser Met Thr Lys Tyr Ser Asp Ser Val Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 160
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 160

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

<210> 161
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 161

Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Met His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 162

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 162

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

<210> 163

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 163

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

[0067]

<210> 164

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 164

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

Gly

<210> 165

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 165

Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 166

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 166

Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 167

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 167

Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 168

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

[0068]

<400> 168

Val Ile Thr Ser Gly Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 169

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 169

Lys Ile Thr Arg Gly Gly Ala Ile Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 170

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 170

Leu Ile Thr Ser Thr Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 171

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR2

<400> 171

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

<210> 172

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR3

<400> 172

Val Arg Gly Thr Ala Arg Asp Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 173

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR3

<400> 173

His Thr Ser Ser Tyr Ser Asn Trp Arg Val Tyr Asn Asn Asp Tyr
1 5 10 15

[0069]

<210> 174

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR3

<400> 174

Tyr Trp Gly Leu Thr Leu Arg Leu Trp Met Pro Pro His Arg Tyr Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 175

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR3

<400> 175

Gly Arg Tyr
1

<210> 176

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3

<400> 176

Ser Arg Thr Asn Pro Lys Pro Asp Tyr
1 5

<210> 177
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3

<400> 177

Arg Tyr Arg Gly Gly Ala Ala Val Ala Gly Trp Glu Tyr
1 5 10

<210> 178
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3

<400> 178

Asp Arg Arg Thr Asp Cys Lys Lys Gly Arg Val Gly Ser Gly Ser
1 5 10 15

[0070]

<210> 179
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3

<400> 179

Asp Pro Arg Gly Ser Ser Trp Ser Phe Ser Ser Gly Gly Tyr Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 180
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3

<400> 180

Gly Lys Tyr
1

<210> 181
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3

<400> 181

Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr
1 5

<210> 182
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3

<400> 182

Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp His
1 5 10

<210> 183
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3

<400> 183

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

Asn Tyr

[0071]

<210> 184
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3

<400> 184

Asp Ser Leu Ser Gly Ser Asp Tyr Leu Gly Thr Asn Leu Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 185
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3

<400> 185

Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 186
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR3

<400> 186

Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr

	1	5	10
	<210> 187 <211> 7 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> CDR3 <400> 187 Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr 1 5		
	<210> 188 <211> 8 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> CDR3 <400> 188 Glu Thr Val Val Gly Ala Val Tyr 1 5		
[0072]	<210> 189 <211> 8 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> CDR3 <400> 189 Asp Gly Gly Pro Ser Gln Asn Tyr 1 5		
	<210> 190 <211> 7 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> CDR3 <400> 190 Glu Thr Leu Arg Arg Asn Tyr 1 5		
	<210> 191 <211> 12 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> CDR3 <400> 191 Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg 1 5 10		
	<210> 192 <211> 357		

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码单价纳米抗体的核酸

<400> 192
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagge ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc 60
tctgtgtcag cctctggatt cacccttcagt acctactgga tgtattgggt ccgtcaggct 120
ccagggaagg ggcctgactg ggtctcagct attaatgctg gtggtgatag cacatactat 180
gcagacccecg tgaagggecg attcaccate tccagagaca acaacaagaa cagcgtgtat 240
ctgcagatga acagcctgaa acctgaggac acggccctgt attactgtgc gaecgtacga 300
ggcacagctc gtgacttga ctactgggge caggggaccc aggtcacccg tctctca 357

<210> 193
<211> 369
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码单价纳米抗体的核酸

<400> 193
gaggtgaagc tgggtggagtc tgggggagge ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc 60
tctgtgtcac tctctggaag gatcggcagt atcaacgcca tgggctggta tcgccagggt 120
tcaggacaac agcgcgagtt ggtcgcagta agcaggagcg gaggtagcac agacattgct 180
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg gcaagaacac agtgtatctg 240
cagatggaca gcctgaaacc tggagacacg gccgtctatt actgttatgc tcatactca 300
agctatagta attggcgagt ctacaataac gactactggg gccaggggac ccaggtcacc 360
gtctctca 369

<210> 194
<211> 348
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码单价纳米抗体的核酸

<400> 194
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagge ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc 60
acctgtgcag cctctggacg catcggeact atcaatgcca tgggctggta ccgccaggct 120
ccagggaagc agcgcgagtt ggtcgcagtt attactagtg gtggtaggat agactatgca 180
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac ggtgtatctg 240
caaatgaaca gcctgaaacc tggagacacg gccgtctatt actataatgt agaacaggta 300
gtgggtgccg tctactgggg ccaggggacc caggtcaccc tctctca 348

<210> 195
<211> 348
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码单价纳米抗体的核酸

<400> 195

[0073]

```

gaggatgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggaag gatgggcaat atcaatgcc a tgggctggta tgcgccaggt      120
ccagggaagg agcgcgagtt ggtcgcaaaa attactaggg gtggtgcgat aacctatgca      180
gactccgtga agggccgatt caccatcgcc agagacaata ttctgaacac ggcgatctcg      240
caaatgaacg acctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt attataatgt agatgggggg      300
cccagtcaaa actactgggg ccaggggacc caggtcaccg tctctctca      348

```

<210> 196
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码单价纳米抗体的核酸

```

<400> 196
gaggatgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcgat gattatgcc a taggctggtt ccgccagggc      120
ccagggaagg agcgtgagag ggtctcatgt attagtggta gtgatggtag cacatactat      180
gcagactccg tcaagggccg attcaaccatc tccagtgaac acgccaagaa caccgtgtat      240
ctgcaaatga acaacctgaa acccgaggac acggccgttt attattgtgc agcatattgg      300
ggactaacgc tcaggetatg gatgcccccc caccggtatg actactgggg ccaggggacc      360
caggtcaccg tctctctca      378

```

[0074]

<210> 197
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码单价纳米抗体的核酸

```

<400> 197
gaggatgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc tctgagcctc      60
tcctgtgcag cctctggact tatcttcaga ctacgtggca tggcctggta tgcgccaggt      120
ccggggaggg agcgcgagtg ggtcgcagtg cttaccaaa g atggtaccct acactatgca      180
gaccccgatg agggccgatt caccatctcc agaacaacac ccgagaacac gtggtatctg      240
caaatgaaca gccctgaaac tgaggacaca gccatctatt actgtaatac gggccgttac      300
tggggccagg ggaccaggt caccgtctcc tca      333

```

<210> 198
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码单价纳米抗体的核酸

```

<400> 198
gaggatgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc actgagactc      60
tcctgtgcag cctctggaac catcggcacg atcagagcca tgggctggta ccgccaggt      120
ccagggaagg agcgcgagtt ggtcgcatgt attactagta ctggtaggat aaactatgca      180
gactccgtga agggccgatt caccattgga agagacaatg ccaagaacac ggcgatctcg      240

```

	caaatgaaca acctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt actataatat cgaaacacta	300
	cgacgtaact actggggcca ggggacccag gtcaccgtct cctca	345
	<210> 199	
	<211> 354	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 编码单价纳米抗体的核酸	
	<400> 199	
	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc	60
	tectgtgcag cctctggacg cacttttagt aactatgcc a tgggttggtt cggccaggcc	120
	acaggggaagg agcgtgagtt tgtagcagct attaacaaga gtggtgggaa cacacactat	180
	gcaggctecg tgaaggggcg attaccatc tccagagaca acgccaagaa cagcgtgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgaa acctagggac acggccgttt attactgtgc agcgtcggg	300
	actaacceta agcctgacta ctggggccag gggaccagg tcaccgtctc ctca	354
	<210> 200	
	<211> 366	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 编码单价纳米抗体的核酸	
[0075]	<400> 200	
	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc	60
	tectgtgcag cctctggacg ctctttagt cgcagtcca tgggttggtt cggccaggct	120
	ccaggggaagg agcgtgaatt tgtagcaggt attagctggg gtggtagata ctcatactat	180
	gcagactcgg tgaaggggcg attaccatc tccagagaca acgccaagaa caccgtgtct	240
	ctacaaatga acagcctgaa acctcaggac acggccgttt attactgtgc agcaagatac	300
	cggggaggcg cggcagtagc tgggtgggag tactggggcc aggggaccca ggtcaccgtc	360
	tectca	366
	<210> 201	
	<211> 372	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 编码单价纳米抗体的核酸	
	<400> 201	
	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc	60
	tcctgtgcag cctccggatc cactttggcc tattataccg taggttggtt ccgccgggcc	120
	ccaggggaagg agcgcgaggg gatctcatgt attagtagta gtgatggtag cacatactat	180
	gcagactcgg tgaaggggcg attaccatc tccagagaca atgccaagaa tacggtgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc ggctgacaga	300
	cgtaccgact gtaaaaagg tagagtcggt tctggttcct ggggccaggg gaccagggtc	360
	accgtctcct ca	372

<210> 202
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码单价纳米抗体的核酸

<400> 202
 aaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggg ctggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60
 tctgtgtcag cctccggaag cgccttcaat tactatgtca tggcctggtt ccgccagget 120
 caagggaagg agcgtgagtt tgtagcaget attagcaagc gtggtagtat gacaaagtat 180
 tcagactccg tgcagggccg gttcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacggtgtat 240
 ctgcacatga acagcctgaa acctgaggat acggccgttt attactgtgc agcagaccct 300
 cgcggcagta gctggtcatt ttcgtccggg ggttatgact actggggcca ggggaccag 360
 gtcaccgtct cctca 375

<210> 203
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码单价纳米抗体的核酸

<400> 203
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggg ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60
 tctgtgttag cctctgggaat catcttcaga ctcagtgcgt tgggttggaac acgccagggt 120
 ccaggaaagg cgcgcgagtg ggtcgcaggt attaacagtg atggtacgac caactacgac 180
 gacccegtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac gatatatctg 240
 cacatggaca tgcetgaacc tgaggatacg gccgtctatt actgtgcctc cggaaagtac 300
 cggggccagg ggaccagggt caccgtctcc tca 333

<210> 204
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码单价纳米抗体的核酸

<400> 204
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggg ttggtgcagg ctgggggagtc tctgagactc 60
 tctgtgtcag cctctgggaag cacccttcgat ttcaaaagtc tgggttggtta ccgccagcct 120
 ccagggaagg agcgcgaggg ggtcgcagcg attaggctta gtggtaacat gcactatgca 180
 gagtccgtga agggccgatt caccatctcc aaagccaacg ccaagaacac agtgtatctg 240
 caaatgaaca gccctgagacc tgaggacacg gccgtctatt actgtaaggt gaacattcgg 300
 ggccaggact actggggcca ggggaccag gtcaccgtct cctca 345

<210> 205
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

[0076]

<223> 编码单价纳米抗体的核酸	
<400> 205	
gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc tctgacgctc	60
tctgtgtcag tctctggaag ctccttcaga atcaatacca tgggctggta ccgccgggct	120
ccaggggaagc agcgcgagtt ggtagcagct cgtgatagag gtggttacct aaactatgta	180
gattccgtga agggccgatt caccgtctcc agagacaacg ccaagcccac aatgtatctg	240
caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt attgtcatgc cgggacccaa	300
gacgggacgg gtccgaattt cgaccactgg ggccagggga cccaggctac cgtctccca	360
<210> 206	
<211> 378	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 编码单价纳米抗体的核酸	
<400> 206	
gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc	60
tctgtgttag cctctggaag catcgtcaga attaatacca tgggctggta ccgccagact	120
ccaggggaagc agcgcgagtt ggtagcagat attaccagtg gtggtaacat aaactatata	180
gacgccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaaca ccaagaacac ggtgtatctg	240
caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt actgtaatgc agagatcgtt	300
gttctgtgtg gagtttgac ccagcgtgcg cggaccggca actactgggg ccaggggacc	360
caggtaaccg tctctcca	378
<210> 207	
<211> 372	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 编码单价纳米抗体的核酸	
<400> 207	
gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc	60
tctgtgtcag cctctggacg cactttcagt agcttgtcca tgggctggtt ccgccaggct	120
ccggggaagg agcgtgcctt tgtagcagcg ctactcgaa atgggtggta cagatactat	180
gcagactccg tgaagggecg attcaaccatc tccagagacg tcccaagaa gacctatata	240
ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgtct attactgtgc agcagatagt	300
cttagtggta gtgactactt aggaaccaac ctgactactt ggggccaggg gaccacggct	360
accgtctctt ca	372
<210> 208	
<211> 372	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 编码单价纳米抗体的核酸	
<400> 208	
gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc	60

tcctgtgcag cctctggacg cacccttcagt gactatgcc a tgggctgggt ccgccaggct	120
ccagggaagg agcgtgagtt tgtagcagct attacgtgga atgggtgtag agtatittat	180
actgcctccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cagcatgtat	240
ctgcaaatga acagcccgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc agcagataaa	300
gacagacgta ctgactatct agggcacccc gtgcctact ggggccaggg gaccagggtc	360
accgtctcct ca	372

<210> 209
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码单价纳米抗体的核酸

<400> 209	
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagga ttggtgcage ctgggggctc tctgagactc	60
tcctgtgtag cctctggacg catcttcagt agcaatgcc a tgggctgggt ccgccaggct	120
ccagggaagg agcgtgagtt tgtagcgccc attacctgga ggagtggcg tgcgcgtac	180
tatgcagact ccgcgaaggg ccgattcacc atctccagag acaacgccaa gaacacggtg	240
tatttgcaaa tgaacagcct gaaacctgag gacacggccc tttattattg tgcagctggt	300
ggtagttcct ggtaagttt tccgccggac tactggggcc aggggaacca ggtcaccgtc	360
tcctca	366

[0078]

<210> 210
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码单价纳米抗体的核酸

<400> 210	
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagag ttggtgcage cgggggggctc tctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggaag catctttaat atcaatgcc a tgggctggta ccgccaggct	120
ccagggaagg agcgcgagtt ggtagtccgt aggactaggg gtggtagtac aacgtatcaa	180
gactccgiga agggccgatt caccatctcc gcagacattg ccaagaaaa gatgtatctc	240
caaatgaaca gccfgaaacc tgaagacacg gccgtctatt actgtatgct agatgaccgt	300
gggggtgtct actgggggtca ggggaaccag gtcaccgtct cctca	345

<210> 211
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码单价纳米抗体的核酸

<400> 211	
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagag ttggtgcagg ctggggggctc tctgacgctc	60
tcctgtgcag tctctggaag caccctcaga atcaatacca tgggctggta ccgccgggct	120
ccagggaagg agcgcgagtt ggtcgcagct cgtgatagag ggggttacat aaactatgta	180
gattccgiga agggccgatt caccgtctcc agagacaacg ccaagccac aatgtatctg	240

caaatgaaca gectgaanacc tgaggacacg gccgtctatt attgtcatgc egggacccaa 300
 gatcggacgg gtcggaattt cgaccgctgg ggccagggga cccaggtcac cgtctcctca 360

<210> 212
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 212

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

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

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

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

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

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

[0079]

Ala Lys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105

<210> 213
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列优化的变体的氨基酸序列

<400> 213

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn
 20 25 30

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

Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 214

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列优化的变体的氨基酸序列

<400> 214

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn
20 25 30

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

Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

[0080]

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

Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 215

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列优化的变体的氨基酸序列

<400> 215

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg Ile Asn
20 25 30

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

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

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

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

Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala Arg Thr
100 105 110

Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 216

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列优化的变体的氨基酸序列

<400> 216

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

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

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

[0081]

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

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

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

Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 217

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列优化的变体的氨基酸序列

<400> 217

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

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

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

Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60

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

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

Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 218
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列优化的变体的氨基酸序列

<400> 218

[0082]

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

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

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

Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 219
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列优化的变体的氨基酸序列

<400> 219

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0083]

<210> 220

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽接头

<400> 220

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

<210> 221

<211> 272

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列优化的双互补位的氨基酸序列

<400> 221

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

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

Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Arg His Tyr Ala Glu Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Ala Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys
 85 90 95
 Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 165 170 175
 [0084] Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
 180 185 190
 Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser
 195 200 205
 Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 210 215 220
 Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
 225 230 235 240
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser
 245 250 255
 Phe Pro Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 260 265 270
 <210> 222
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 序列优化的双互补位的氨基酸序列
 <400> 222
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp Phe Lys

	20	25	30
	Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val		
	35	40	45
	Ala Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Arg His Tyr Ala Glu Ser Val Lys		
	50	55	60
	Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Ala Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu		
	65	70	75 80
	Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys		
	85	90	95
	Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
	100	105	110
	Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
	115	120	125
	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
	130	135	140
	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly		
	145	150	155 160
[0085]	Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly		
	165	170	175
	Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly		
	180	185	190
	Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val		
	195	200	205
	Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn		
	210	215	220
	Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp		
	225	230	235 240
	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr		
	245	250	255
	Leu Gly His Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val		
	260	265	270
	Ser Ser		
	<210> 223		
	<211> 277		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 序列优化的双互补位的氨基酸序列		

<400> 223

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

[0086]

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu
145 150 155 160

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
165 170 175

Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Gly Trp Phe
180 185 190

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp
195 200 205

Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
210 215 220

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
225 230 235 240

Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Gly
245 250 255

Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
260 265 270

Val Thr Val Ser Ser
275

<210> 224

<211> 279
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列优化的双互补位的氨基酸序列

<400> 224

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln
 100 105 110

[0087] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu
 145 150 155 160

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 165 170 175

Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Gly Trp Phe
 180 185 190

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp
 195 200 205

Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 210 215 220

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 225 230 235 240

Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Lys Asp
 245 250 255

Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 260 265 270

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
275

<210> 225

<211> 422

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列优化的双互补位的氨基酸序列

<400> 225

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

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

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

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

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

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

[0088]

Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
145 150 155 160

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
165 170 175

Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
180 185 190

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser
195 200 205

Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
210 215 220

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
225 230 235 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser
245 250 255

Phe Pro Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
260 265 270

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
290 295 300

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
305 310 315 320

Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
325 330 335

Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
340 345 350

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala
355 360 365

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr
370 375 380

[0089]

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
385 390 395 400

Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr
405 410 415

Leu Val Thr Val Ser Ser
420

<210> 226

<211> 426

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列优化的双互补位的氨基酸序列

<400> 226

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

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

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

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

	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Ala	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu
	65					70					75					80
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Lys
					85					90					95	
	Val	Asn	Ile	Arg	Gly	Gln	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
				100					105					110		
	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
			115					120					125			
	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
		130					135					140				
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly
	145					150				155						160
	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly
					165					170					175	
	Ser	Ile	Val	Arg	Ile	Asn	Thr	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
				180					185					190		
	Lys	Gln	Arg	Glu	Leu	Val	Ala	Asp	Ile	Thr	Ser	Gly	Gly	Asn	Ile	Asn
			195					200					205			
[0090]	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser
	210						215					220				
	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr
	225					230					235					240
	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Ala	Glu	Ile	Val	Val	Leu	Val	Gly	Val	Trp
					245					250					255	
	Thr	Gln	Arg	Ala	Arg	Thr	Gly	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
				260					265					270		
	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
			275					280					285			
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
		290					295					300				
	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly
	305					310					315					320
	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Asn	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser
					325					330					335	
	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro
				340					345					350		
	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp
			355				360						365			

Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
370 375 380

Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
385 390 395 400

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser
405 410 415

Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
420 425

<210> 227

<211> 424

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列优化的双互补位的氨基酸序列

<400> 227

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

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

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

[0091]

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

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

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

Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
145 150 155 160

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
165 170 175

Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
180 185 190

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val
195 200 205

Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
210 215 220

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
225 230 235 240

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr
245 250 255

Leu Gly His Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
260 265 270

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
290 295 300

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
305 310 315 320

Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
325 330 335

[0092]

Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
340 345 350

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu
355 360 365

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
370 375 380

Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
385 390 395 400

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln
405 410 415

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
420

<210> 228

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列优化的双互补位的氨基酸序列

<400> 228

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

	20	25	30
	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35	40	45
	Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val		
	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr		
	65	70	75
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
	Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr		
	100	105	110
	Val Ser Ser		
	115		
	<210> 229		
	<211> 30		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> FR1		
	<400> 229		
[0093]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1	5	10
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr		
	20	25	30
	<210> 230		
	<211> 30		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> FR1		
	<400> 230		
	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1	5	10
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg		
	20	25	30
	<210> 231		
	<211> 30		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> FR1		
	<400> 231		
	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1	5	10

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

<210> 232
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR1

<400> 232

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

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

<210> 233
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR1

<400> 233

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

[0094]

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

<210> 234
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR1

<400> 234

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

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

<210> 235
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 235

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

<210> 236

<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 236

Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Arg His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 237
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDR2

<400> 237

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

Lys Gly

<210> 238
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

[0095]

<220>
<223> FR3

<400> 238

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ser Lys Lys Thr Met Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 239
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 239

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ser Lys Asn Thr Met Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 240
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FR3

<400> 240

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	

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

<210> 241

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR3

<400> 241

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Ala	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	

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

<210> 242

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR3

<400> 242

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	

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

<210> 243

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR3

<400> 243

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	

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

<210> 244

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FR3

<400> 244

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Pro	Thr	Met	Tyr	Leu	Gln
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[0096]

	1	5	10	15
	Met Asn Ser	Leu Arg Pro Glu Asp	Thr Ala Val Tyr Tyr	Cys His Ala
		20	25	30
<210>	245			
<211>	11			
<212>	PRT			
<213>	人工序列			
<220>				
<223>	FR4			
<400>	245			
	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	1	5	10	
<210>	246			
<211>	5			
<212>	PRT			
<213>	人工序列			
<220>				
<223>	CDR1			
<400>	246			
[0097]	Thr Tyr Trp Met Tyr			
	1	5		
<210>	247			
<211>	14			
<212>	PRT			
<213>	人工序列			
<220>				
<223>	FR2			
<400>	247			
	Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val Ala			
	1	5	10	
<210>	248			
<211>	5			
<212>	PRT			
<213>	人工序列			
<220>				
<223>	CDR1			
<400>	248			
	Ile Asn Ala Met Gly			
	1	5		

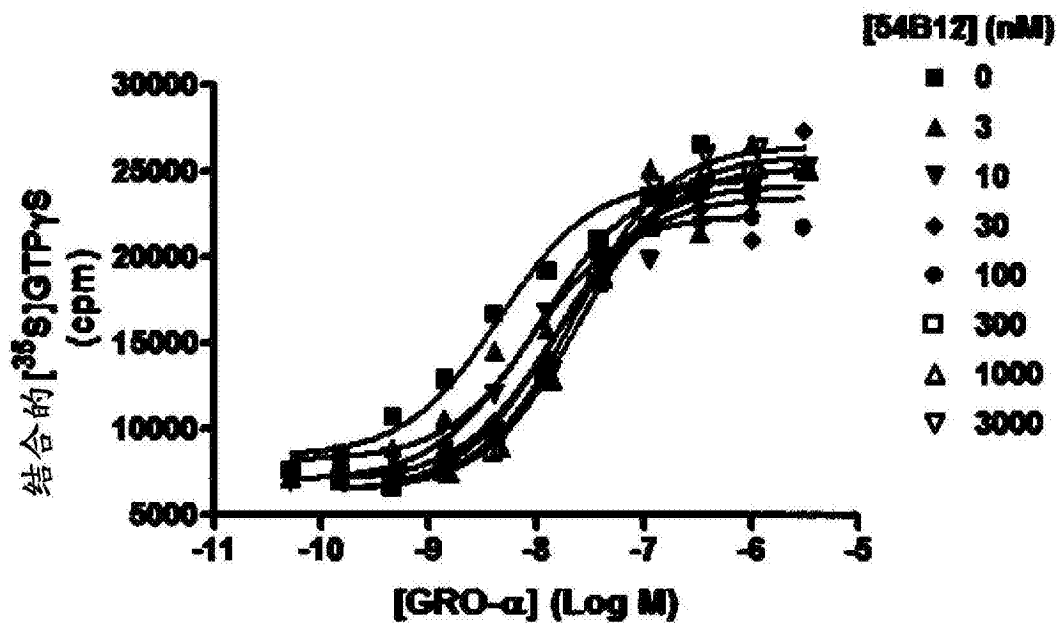


图1a

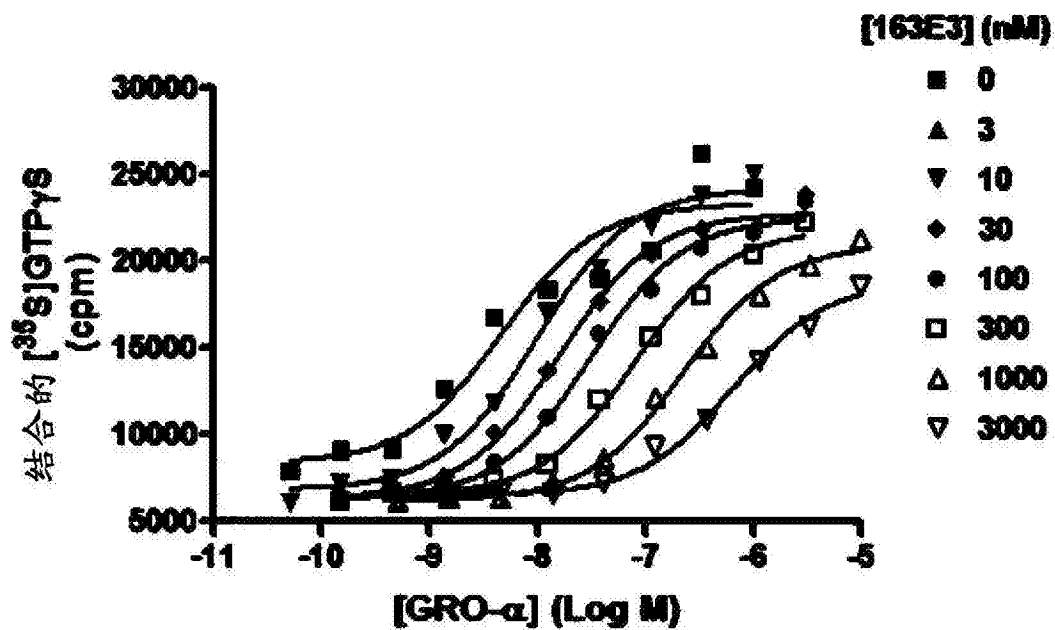


图1b

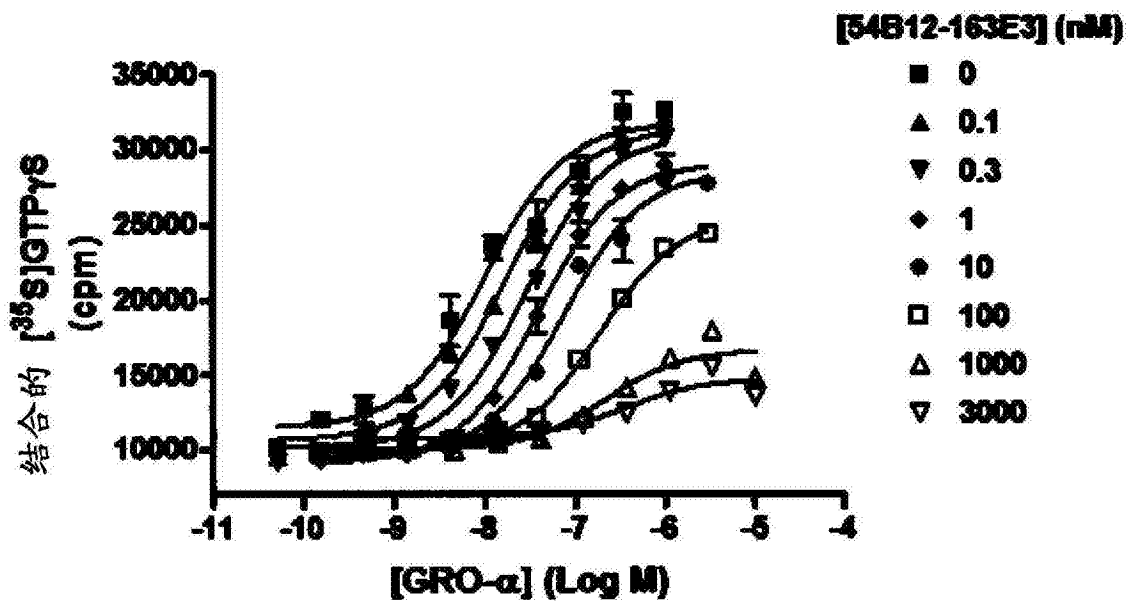


图1c

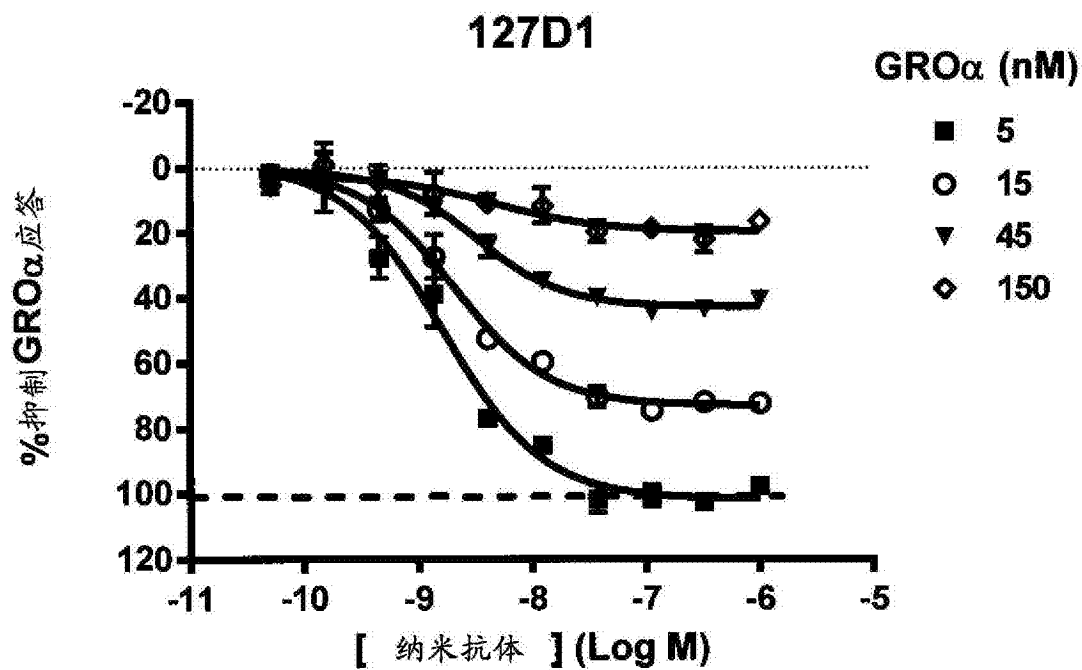


图2a

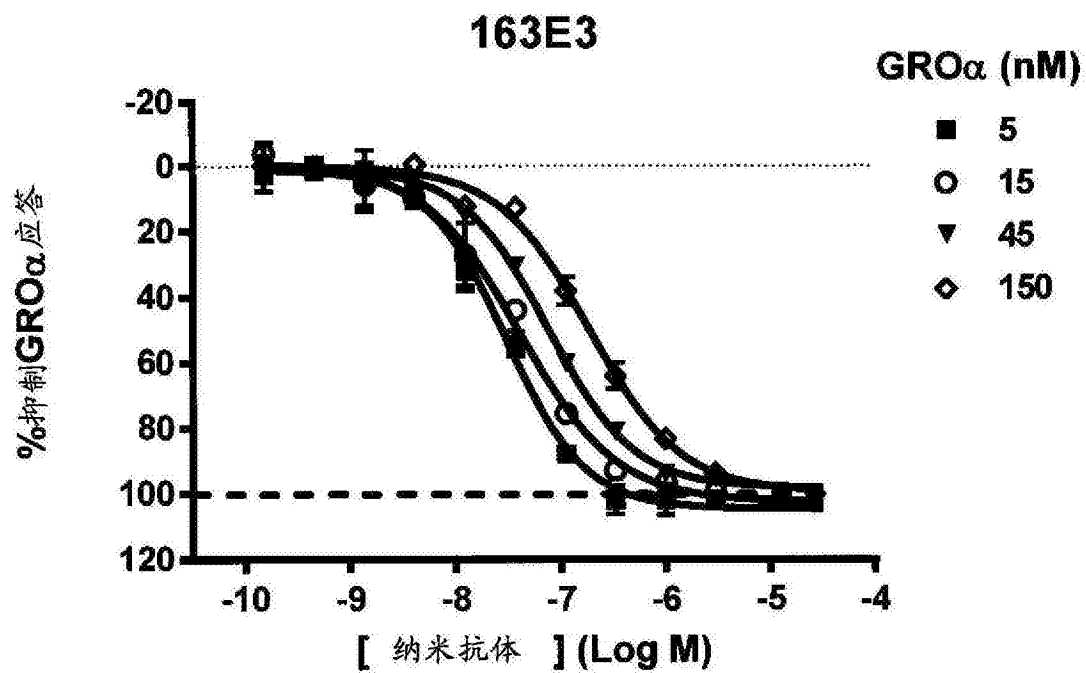


图2b

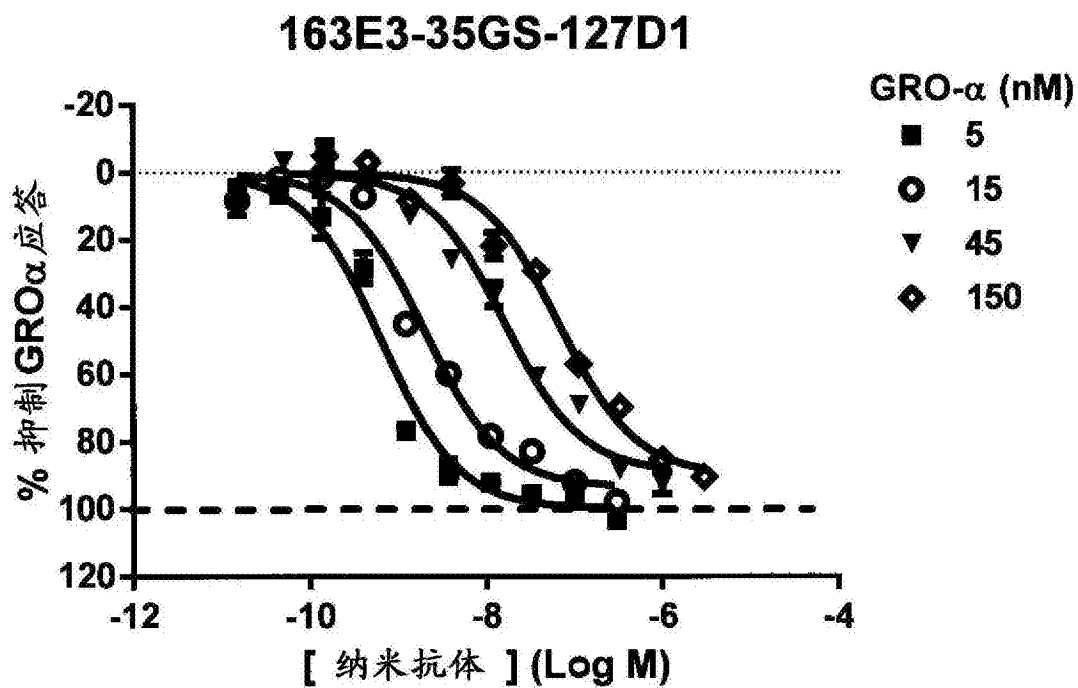


图2c

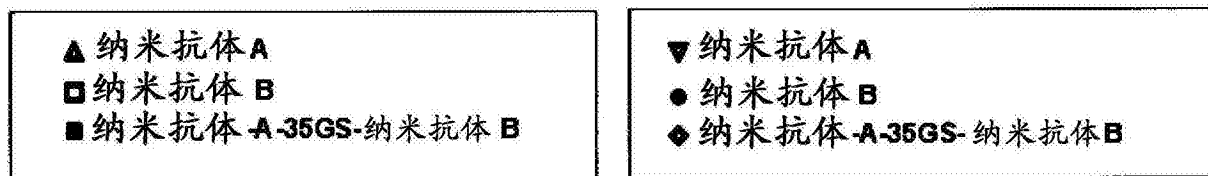
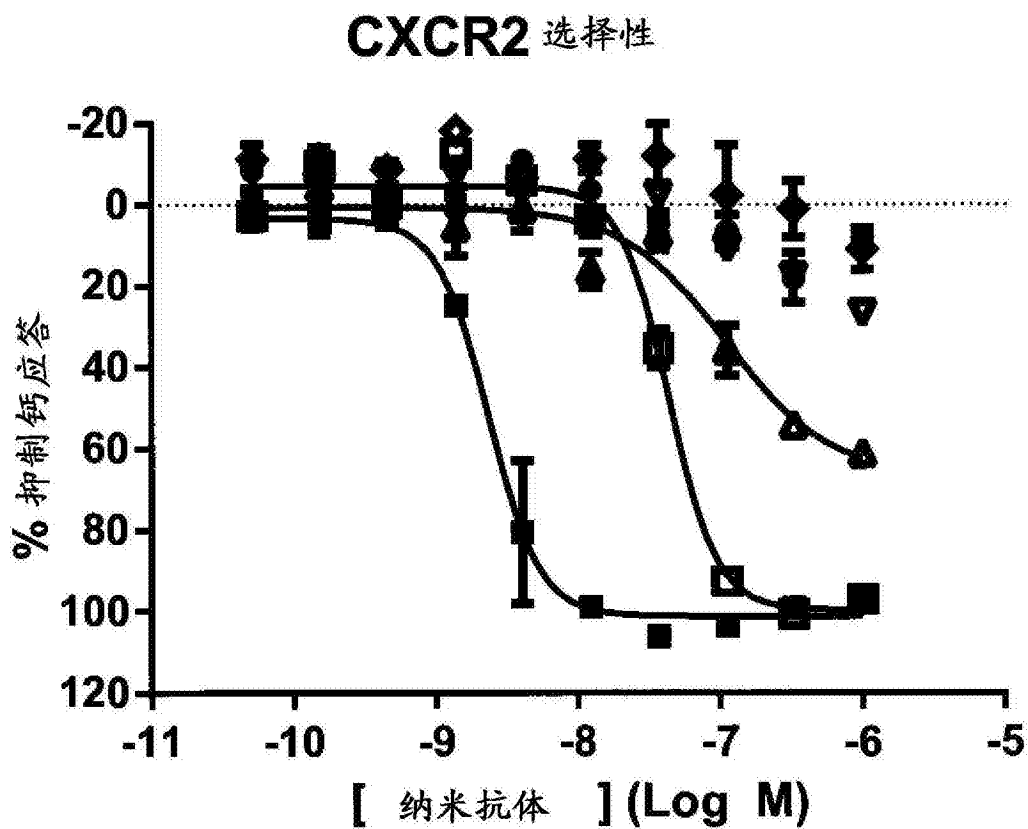


图3

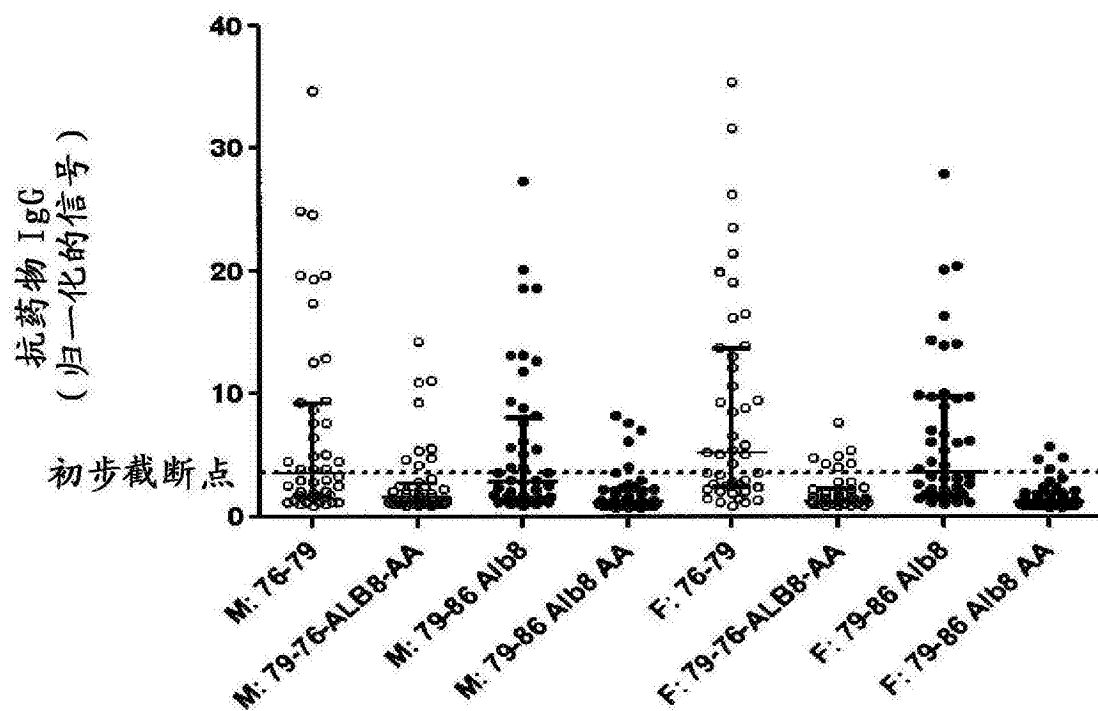


图4

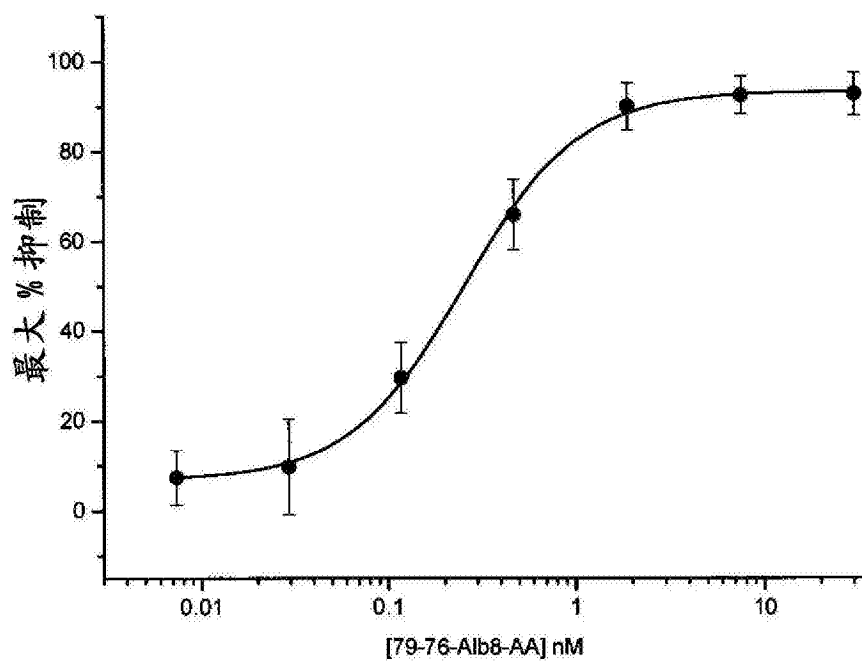


图5