



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2022년05월04일  
(11) 등록번호 10-2394471  
(24) 등록일자 2022년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)  
C07K 14/715 (2006.01) C12N 15/79 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C07K 16/28 (2013.01)  
A61K 38/16 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2020-7037695(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2013년05월08일  
심사청구일자 2021년01월26일  
(85) 번역문제출일자 2020년12월28일  
(65) 공개번호 10-2021-0002365  
(43) 공개일자 2021년01월07일  
(62) 원출원 특허 10-2014-7031160  
원출원일자(국제) 2013년05월08일  
심사청구일자 2018년05월08일  
(86) 국제출원번호 PCT/IB2013/053711  
(87) 국제공개번호 WO 2013/168108  
국제공개일자 2013년11월14일  
(30) 우선권주장  
61/644,582 2012년05월09일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
W02011038149 A2

(73) 특허권자  
노파르티스 아게  
스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35  
(72) 발명자  
브라운, 자린  
영국 알에이치12 5에이비 서섹스주 호삼 웨스트  
서섹스 워블허스트 로드 노바티스 파마슈티컬스  
유케이 리미티드  
브래들리, 미셸  
영국 알에이치12 5에이비 서섹스주 호삼 웨스트  
서섹스 워블허스트 로드 노바티스 파마슈티컬스  
유케이 리미티드  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 CXCR2에 대한 이중파라토프성 결합 폴리펩티드 및 그의 용도

**(57) 요약**

본 발명은 케모카인 수용체 CXCR2에 대해 지시되거나 또는 이에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드 및 특히 CXCR2로부터의 신호 전달을 조정할 수 있는 폴리펩티드에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드를 발현할 수 있는 핵산, 벡터 및 숙주 세포, 폴리펩티드를 포함하는 제약 조성물, 및 CXCR2의 이상 기능을 수반하는 질환의 치료를 위한 상기 폴리펩티드 및 조성물의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

*C07K 14/715* (2013.01)

*C12N 15/79* (2013.01)

*Y10S 530/809* (2013.01)

(72) 발명자

**찰튼, 스티븐 존**

영국 알에이치12 5에이비 서섹스주 호삼 웨스트 서섹스 워블허스트 로드 노바티스 파마슈티컬스 유케이 리미티드

**반 히케, 지노 안셀무스**

영국 알에이치12 5에이비 서섹스주 호삼 웨스트 서섹스 워블허스트 로드 노바티스 파마슈티컬스 유케이 리미티드

**크로미, 카렌**

벨기에 베-9052 쓰위나드 테크놀로지파크 21 아브 린스 엔브이

**뎀브레히트, 브루노**

벨기에 베-9052 쓰위나드 테크놀로지파크 21 아브 린스 엔브이

**스테펜센, 소렌**

벨기에 베-9052 쓰위나드 테크놀로지파크 21 아브 린스 엔브이

**바우마이스터, 유디트**

벨기에 베-9052 쓰위나드 테크놀로지파크 21 아브 린스 엔브이

**보우세, 마리-파울**

벨기에 베-9052 쓰위나드 테크놀로지파크 21 아브 린스 엔브이

**보우톤, 카를로**

벨기에 베-9052 쓰위나드 테크놀로지파크 21 아브 린스 엔브이

**부위세, 마리-안게**

벨기에 베-9052 쓰위나드 테크놀로지파크 21 아브 린스 엔브이

**스너크, 비를레**

벨기에 베-9052 쓰위나드 테크놀로지파크 21 아브 린스 엔브이

**스타엘렌스, 스테파니**

벨기에 베-9052 쓰위나드 테크놀로지파크 21 아브 린스 엔브이

명세서

청구범위

청구항 1

케모카인 수용체 CXCR2에 결합할 수 있거나, 친화도를 갖거나, 특이성을 갖고, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4의 구조를 갖는, 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드로서,

(a) 서열 7에 제시된 아미노산의 서열로 이루어지는 선형 펩티드에 결합할 수 있거나, 또는

(b) 인간 CXCR2의 외부 루프 내의 에피토프에 결합하고, 여기서 인간 CXCR2의 외부 루프는 서열 1의 아미노산 잔기 106 내지 120, 184 내지 208 및 274 내지 294이고,

여기서, CDR1 내지 CDR3이 하기 아미노산 서열로부터 선택되고,

CDR1	CDR2	CDR3
INTMG	ARDRGGYINYVDSVKG	GTQDRTGRNFDR
LSALG	GINSDGTTNYADPVKG	GKY
FKVMG	AIRLSGNMHYAESVKG	NIRGQDY
INTMG	DITSGGNINYIDAVKG	EIVVLVGVWTQRARTGNY
DYAMG	AITWNGGRVFYTASVKG	DKDRRTDYLGHVPVAY
SNAMG	AITWRSGGSAYYADSAKG	GGSSWLSFPPDY
INAMG	RRTRGGSTTYQDSVKG	DDRGGVY
INTMG	DITSGGNINYADSVKG	EIVVLVGVWTQRARTGNY
FKVMG	AIRLSGNRHYAESVKG	NIRGQDY
SNAMG	AITWRSGGSAYYADSVKG	GGSSWLSFPPDY

하기 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하거나 또는 그것으로 이루어지거나, 또는 하기 아미노산 서열의 중 어느 하나의 프레임워크 영역에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그것으로 이루어지는 것인 폴리펩티드.

<b>54B12</b>	SEQ ID NO. 90	EVQLVESGGGLVQAGGSLTSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQRELVAARDRG GYINYVDSVKGRFTVSRDNAKPTMYLQMNSLKPEDTAVVYCHAGTQDRTGRNF DRWGQGTQVTVSS
<b>CXCR20 104</b>	SEQ ID NO. 219	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSTFRINTMGWYRQAPGKQRELVAARDRG GYINYVDSVKGRFTISRDNKPTMYLQMNSLRPEDTAVVYCHAGTQDRTGRNFD RWGQGTQVTVSS
<b>137B07</b>	SEQ ID NO. 36	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVSGSIIFRLSALGWTRQGPQKAREWVAGINSD GTTNYADPVKGRFTISRDNKNTIYLHMDMLKPEDTAVVYCASGKYRGGTQVT VSS
<b>127D01</b>	SEQ ID NO. 37	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTDFKVMGWYRQPPGKQREGVAAIRLS GNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNSLRPEDTAVVYCKVNIRGQDYWGQ GTQVTVSS
<b>097A09</b>	SEQ ID NO. 39	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVSGSIVRINTMGWYRQTPGKQRELVADITSGG NINYIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVVYCNAEIVLVGVWTQRA RTGNYWGQGTQVTVSS
<b>163D02</b>	SEQ ID NO. 41	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREVAAITW NGGRVFYASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVVYCAADKDRRTDYL GHPVAYWGQGTQVTVSS
<b>163E03</b>	SEQ ID NO. 42	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVSGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREVAAITWR SGGSAYYADSAGKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVVYCAAGGSSWLSFPP DYWGQGTQVTVSS
<b>2B2</b>	SEQ ID NO. 43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQRELVRRTRG GSTTYQDSVKGRFTISADIAKNTMYLQMNSLKPEDTAVVYCLDDRGGVYWGQ GTQVTVSS
<b>CXCR20 059</b>	SEQ ID NO. 213	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQRELVRRTRG GSTTYQDSVKGRFTISADISKNTMYLQMNSLRPEDTAVVYCLDDRGGVYWGQ TLVTVSS

<b>CXCR20 063</b>	SEQ ID NO. 214	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQRELVRRTRG GSTTYQDSVKGRFTISADISKNTMYLQMNSLRPEDTAVVYCLDDRGGVYWGQ TLVTVSS
<b>CXCR20 061</b>	SEQ ID NO. 215	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIVRINTMGWYRQAPGKQRELVADITSGG NINYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVVYCNAEIVLVGVWTQRA RTGNYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR20 079</b>	SEQ ID NO. 216	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTDFKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLS GNRHYAESVKGRFTISRANSKNTVYLQMNSLRPEDTAVVYCKVNIRGQDYWGQ TLVTVSS
<b>CXCR20 076</b>	SEQ ID NO. 217	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREVAAITWR SGGSAYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVVYCAAGGSSWLSFPP DYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR20 086</b>	SEQ ID NO. 218	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREVAAITWN GGRVFYASVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVVYCAADKDRRTDYLGH PVAYWGQGTQVTVSS

청구항 2

제1항에 있어서, 서열 90 또는 서열 219에 제시된 아미노산의 서열을 포함하거나 그것으로 이루어지는 것인 폴리펩티드.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인이  $V_{H1}$  도메인의 구조를 갖는 것인 폴리펩티드.

**청구항 4**

제1항에 있어서,

- (a) 서열 1(CXCR2)의 아미노산 F11, F14 및 W15을 포함하는 CXCR2의 에피토프에 결합하거나, 또는
- (b) 서열 1의 아미노산 잔기 W112, G115, I282 및 T285를 포함하는 에피토프에 결합하는 폴리펩티드.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인으로 이루어지는 것인 폴리펩티드.

**청구항 6**

제1항에 있어서, 폴리펩티드의 C-말단이 적어도 하나의 추가의 아미노산 잔기의 서열에 대한 연장부를 포함하는 것인 폴리펩티드.

**청구항 7**

제6항에 있어서, C-말단 연장부가 A, AA, AS, AST, ASTKP 또는 GGS인 폴리펩티드.

**청구항 8**

제7항에 있어서, C-말단 연장부가 2개의 알려진 잔기로 이루어진 폴리펩티드.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 하나 이상의 추가 결합 사이트 또는 도메인을 함유하는 것인 폴리펩티드.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 하나 이상의 추가 결합 사이트 또는 도메인이 혈청 단백질에 결합하는 것인 폴리펩티드.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 혈청 단백질이 혈청 알부민인 것인 폴리펩티드.

**청구항 12**

제1항에 따른 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자.

**청구항 13**

제12항에 따른 핵산 분자를 포함하는 벡터.

**청구항 14**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 단리된 숙주 세포.

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 케모카인 수용체 CXCR2에 대해 지시되거나 또는 그에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드 및 특히 CXCR2로부터의 신호 전달을 조정할 수 있는 폴리펩티드에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드를 발현할 수 있는 핵산, 벡터 및 숙주 세포, 폴리펩티드를 포함하는 제약 조성물, 및 CXCR2의 이상 기능을 수반하는 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD) 및 다른 질환의 치료를 위한 상기 폴리펩티드 및 조성물의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD)은 대부분의 경우 진행성이고 기도 기능을 감소시키는 폐 유조직의 파괴와 함께 유해한 입자에 대한 폐의 비정상적인 염증 반응과 연관된 기류 제한을 특징으로 하는 다양한 장애를 설명하기 위해 사용되는 용어이다 (문헌 [Barnes PJ et al., 2003, Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. Eur. Respir J, 22, 672-688; Barnes PJ et al., 2004, Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. Pharmacol. Rev. 56, 515-548]). 유전 및 환경 요인이 COPD의 발병에 기여하지만, 흡연이 가장 중요한 단일 원인이고, 재발되는 폐 감염은 폐 기능의 점진적 감소를 발생시킨다. 금연은 초기에 적용될 경우에만 질환의 진행을 감소시키고, 유의한 증상이 발생한 후에는 효과가 거의 없다. 몇몇 동반 상태, 예컨대 천식, 심혈관 질환, 우울증 및 근육 소모가 COPD와 연관된다 (문헌 [Mannino DM and Buist S, 2007 Global burden of COPD: risk factors, prevalence and future trends. Lancet, 370, 765-773]).

[0003] 케모카인은 화학주성 인자 중에서 우세하게 존재하고, 따라서 COPD 폐의 만성 염증 및 급성 악화 동안 그의 추가의 확대의 조절시에 주요 역할을 수행한다. 케모카인 IL-8 (CXCL8), GRO α (CXCL1) 및 ENA-78 (CXCL5)의 생물학적 활성은 신체 전체에 걸쳐 백혈구 및 많은 다른 세포 유형 상에 존재하는 세포-표면 수용체인 CXCR1 및 CXCR2의 2개의 집단에 의해 매개된다. 백혈구의 이동은 IL-8, GRO α, β, γ, ENA78 및 GCP-2를 비롯한 몇몇 리간드에 결합하는 CXCR2를 통해 주로 매개된다. 이와 반대로, CXCR1은 IL-8에 의해 및 보다 작은 정도로 GCP-2에 의해 선택적으로 활성화된다. 생체내에서 인간 호중구 화학주성이 하나 또는 양쪽 수용체에 의해 매개되는지의 여부는 아직 불분명하다.

[0004] CXCR2는 CXCR1과 아미노산 수준에서 78% 상동성을 공유하고, 양쪽 수용체는 상이한 분포 패턴으로 호중구 상에 존재한다. CD8+ T 세포, NK, 단핵구, 비만 세포, 상피, 내피, 평활근 및 중추 신경계 내의 다수의 세포 유형을 포함하는 다양한 세포 및 조직 상에서의 CXCR2의 발현은 상기 수용체가 구성적 상태 하에 다수의 급성 및 만성 질환의 병리생리상태에서 광범위한 기능적 역할을 수행할 수 있음을 시사한다. CXCR2 활성화는 구아닌 뉴클레오티드-결합 단백질의 Gi 패밀리와 수용체의 커플링을 자극하고, 이는 다시 세포내 이노시톨 포스페이트의 방출, 세포내 Ca<sup>2+</sup> 증가, 및 ERK1/2-의존성 메카니즘에 의한, 케모카인 구배로 유도된 세포 이동과 연관된 세포내 단백질의 인산화를 자극한다. 일단 활성화되면, CXCR2는 인산화되고, 아레스틴/다이아민-의존성 메카니즘을 통해 신속하게 내재화되어 수용체 탈감작화를 유발한다. 이러한 과정은 대부분의 다른 GPCR에서 관찰된 바와 유사하지만, CXCR2의 효능제-유도된 내재화의 비율 및 정도는 CXCR1에서 관찰된 것보다 더 크다 (문헌 [Richardson RM, Pridgen BC, Haribabu B, Ali H, Synderman R. 1998 Differential cross-regulation of the human chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. Evidence for time-dependent signal generation. J Biol.

Chem., 273, 23830-23836)].

[0005]

IL-8은 COPD에서 호중구성 염증의 매개자로서 오랫동안 제시되었다 (문헌 [Keatings VM et al., 1996, Differences in IL-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in induced sputum from patients with COPD and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153, 530-534; Yamamoto C et al. 1997 Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest*, 112, 505-510]). COPD 환자로부터의 기관지 기도, 소기도 및 폐 유조직의 생검에서, 특히 기도 루멘에 T 세포의 침윤 및 호중구 수의 증가가 존재한다 (문헌 [Hogg JC et al. 2004, The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Eng. J. Med.* 350, 2645-2653]). 호중구는 COPD를 갖는 환자의 폐에서 증가하고, 이는 질환 중증도와 상관된다 (문헌 [Keatings VM et al., 1996, Differences in IL-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in induced sputum from patients with COPD and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153, 530-534]). 또한, TNF $\alpha$ 의 수준은 COPD를 갖는 환자의 객담에서 증가하고, 이는 기도 상피 세포로부터 IL-8을 유도한다 (Keatings). GRO $\alpha$  농도는 정상 흡연자 및 비-흡연자에 비해 COPD를 갖는 환자의 유도된 객담 및 기관지 폐포 세척 (BAL) 유체에서 현저하게 증가한다 (문헌 [Traves SL et al. 2002, Increased levels of the chemokines GRO $\alpha$  and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax*, 57, 50-595; Pesci A. et al. 1998, Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with COPD. *Eur Respir J.* 12, 380-386]). GRO $\alpha$ 는 TNF $\alpha$  자극에 반응하여 폐포 대식세포 및 기도 상피 세포에 의해 분비되고, 호중구 및 단핵구에 대해 화학주성인 CXCR2를 선택적으로 활성화시킨다. COPD 환자에서 GRO $\alpha$ 에 대한 단핵구 화학주성 반응의 증가가 존재하고, 이는 이들 세포에서 CXCR2의 증가된 교체 또는 재순환과 관련될 수 있다 (문헌 [Traves SL et al., 2004, Specific CXC but not CC chemokines cause elevated monocyte migration in COPD: a role for CXCR2. *J Leukoc. Biol.* 76, 441-450]). 바이러스성 및 박테리아성 폐 감염은 종종 기도에서 호중구 수의 증가를 특징으로 하는 COPD 환자의 종종 악화를 발생시킨다 (문헌 [Wedzicha JA, Seemungal TA., 2007, COPD exacerbations: defining their cause and prevention, *Lancet* 370 (9589): 786-96]). COPD의 급성 종종 악화를 갖는 환자의 기관지 생검은 유의하게 증가된 양의 ENA-78, IL-8 및 CXCR2 mRNA 발현을 보였고 (문헌 [Qiu Y et al., 2003, Biopsy neutrophilia, neutrophil chemokine and receptor gene expression in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168, 968-975]), 객담은 증가된 호중구 수를 나타내었으며 (문헌 [Bathorn E, Liesker JJw, Postma DS et al., Change in inflammation in out-patient COPD patients from stable phase to a subsequent exacerbation, (2009) *Int J COPD*, 4(1): 101-9]), 이는 COPD 및 상기 질환의 종종 악화 둘 다에서 상기 수용체의 잠재적 역할을 시사한다. CXCR2 mRNA의 증가된 발현이 기관지 생검 시편에서 보이고, 이는 조직 호중구의 존재와 연관된다 (Qiu 2003). ENA-78은 상피 세포로부터 우세하게 유래되고, COPD의 악화 동안 상피 세포 내에 ENA-78 발현의 현저한 증가가 존재한다 (Qiu 2003). IL-8, GRO $\alpha$  및 ENA-78의 농도가 COPD 기도에서 증가하고, 3개의 모든 리간드가 CXCR2를 통해 신호를 전달하기 때문에, 선택적 길항제를 사용한 상기 공통적인 수용체의 차단은 상기 질환에서 효과적인 항염증 전략이 될 것이다.

[0006]

COPD는 서서히 및 점진적으로 진전되고, 질환 진행은 전통적으로 폐-기능 시험, 예컨대 강제 호기량의 폐활량 측정 (FEV1)을 사용하여 평가된다. 예상 FEV1이 <50%인 환자는 심각한 것으로 분류된다. 단지 5%의 경도 내지 중등도 환자에 비해 거의 35%의 종종 COPD 환자가 12세 이내에 질환으로 사망하기 때문에 폐 기능은 사망률과 밀접하게 관련된다. COPD는 세계적으로 네 번째의 주요 사망 원인이고 (World Health Organization (WHO), World Health Report, Geneva, 2000. URL: [http://www.who.int/whr/2000/en/whr00\\_annex\\_en.pdf](http://www.who.int/whr/2000/en/whr00_annex_en.pdf)로부터 이용가능함), 앞으로 수십년 내에 그의 유병률 및 사망률의 추가의 증가가 예측될 수 있다 (문헌 [Lopez AD, Shibuya K, Rao C et al., 2006, Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections, *Eur Respir J*, 27(2), 397-412]). 악화는 질병 악순환의 핵심 인자이고, 주로 대부분의 COPD 입원의 원인이 되고 있다 (BTS (British Thoracic Society), 2006, Burden of Lung Disease Report, 2<sup>nd</sup> ed, [http://www.brit-thoracic.org.uk/Portals/0/Library/BTS%20Publications/burden\\_of\\_lung\\_disease2007.pdf](http://www.brit-thoracic.org.uk/Portals/0/Library/BTS%20Publications/burden_of_lung_disease2007.pdf)). 매년 평균 발생률은 증상-규정된 악화의 경우 2.3, 보건-규정된 악화의 경우 2.8이었다 (문헌 [O'Reilly JF, Williams AE, Holt K et al., 2006, *Prim Care Respir J.* 15(6):346-53]). 보다 이른 진단 및 환자의 악화에 대한 개선된 관리 및 개선된 역제는 이들 입원에 의해 이미 부담을 준 자원에 대한 부담 감소를 도울 것이다. COPD에 대한 이용가능한 치료는 주로 일시적이며, 질환과 연관된 폐 기능의 감소 또는 기도의 진행적 파괴를 중지시키는 이용가능한 요법은 존재하지 않는다. 현재의 치료제, 예컨대 단기 및 장기 지속성  $\beta$ -아드레날린성 기관지확장제, 흡입 항콜린제 (무스카린성 길항제) 및 흡입용 코티코스테로이드가 질환의 증상 및 악화를 치료하기 위해 사용된다. 현재의 코티코스테로이드 요법의 주요 제한은 환자가 코티코스테로이드에 대해 내성을 보

여 이들 약물의 항염증 작용을 불활성화시키기 때문에 이들이 비효과적으로 된다는 점이다. 명백하게, COPD의 진행을 예방하는 신규 약물에 대한 충족되지 않는 큰 의학적 요구가 계속 존재한다. COPD에서 교환되는 염증-세포는 다중 케모카인에 의해 조정되고, 따라서 LMW 길항제를 사용한 케모카인 수용체의 차단이 상기 질환의 효과적인 항염증 전략일 수 있기 때문에, 케모카인 수용체 길항제가 COPD 요법의 매력적인 접근법이다. COPD의 중요한 특징은 정상 흡연자에서 관찰되는 염증 반응의 증폭이고, 따라서 요법의 목적은 염증 세포 침윤을 완전히 억제하는 것이 아니라, COPD가 없는 정상 흡연자에서 관찰되는 수준으로 저하시키는 것이다. 항-CXCR2는 특이적으로 작용함으로써 스테로이드와 연관된 일반적인 면역 억제를 방지할 것이고 - CXCR1 활성의 보존은 COPD 및 CF의 숙주 방어에 중요한 기준선 호중구 활성화를 허용할 것이다. 대부분의 COPD 약물은 현재 전신 부작용을 감소시키기 위해 흡입에 의해 투여되지만, 케모카인 길항제는 순환 염증성 세포에서 발견되는 수용체에 대해 작용하기 때문에, 전신 투여가 최적일 것이다. 이는 COPD에서 침범된 소기도 및 폐 유조직에 도달하기 위한 효율적인 방법을 제공할 것이다.

[0007] 시토카인 및 인터류킨 수용체와 달리 케모카인 수용체는 7TM-GPCR의 고도로 '약물에 의한 표적화가 가능한' 슈퍼패밀리에 속한다. 그럼에도 불구하고, 강력한 길항제를 발견하기 위한 초기 시도는 작은 펩티드 또는 생원성 아민 리간드를 갖는 GPCR을 사용한 실험을 기초로 하여 예상되는 것보다 더 많은 어려움에 직면하였다. 케모카인-수용체 길항제에 초점을 맞춘 소분자 약물-발견 프로그램에 대한 노력으로 케모카인 수용체의 특질 및 소분자가 길항제로서 작용하기 위해 필요한 구조적 요소가 점진적으로 이해되기 시작하였다. 흥미롭게도, 확인된 근본적으로 구별되는 화학적 연속물의 수에 의해 나타내어지는 바와 같이, CC-케모카인-수용체 길항제의 구조적 다양성은 CXC-케모카인-수용체 길항제보다 상당히 더 높고, 이는 길항제 발견의 상대적 어려움이 수용체의 2개의 부류 사이에서 상이할 수 있음을 시사한다.

[0008] 케모카인 수용체는 일반적으로 길항하기 어려운 표적으로 입증되었고, 강력하고 선택적인 CXCR2 길항제를 확인하기 위해 지대한 노력이 필요하였다. 제1 저분자량 CXCR2 길항제가 1998년도에 기재되었고, 그 이후로 다수의 비-경쟁적 알로스테릭 CXCR2 길항제가 개발되었으며, 이 중 몇몇은 지금 임상 시험이 진행되고 있다. 그럼에도 불구하고, CXCR2 기능의 보다 우수하고 보다 강력한 길항제에 대한 필요성이 명백하게 존재한다.

[0009] 이뮤노글로불린 부류의 분자는 지난 10년 정도에 걸쳐 그의 임상적 유용성에 있어 거대한 확장을 보였다. 표적에 대한 그의 특이성 및 이를 재조합 기술을 이용하여 조작하는 능력은 질환에 대한 고도로 지시된 치료 요법을 개발하기 위한 엄청난 잠재력을 제공한다. 종래의 4쇄 항체, Fab 및 F(ab)<sub>2</sub> 단편, 단일 도메인 항체 (D(ab)), 단일 쇠 Fv 및 나노바디를 비롯한 수많은 유형의 이뮤노글로불린 분자 및 변형된 이뮤노글로불린 분자가 적합하게 조작되기에 잠재적으로 이용가능하다. 이들은 CXCR2의 2개 이상의 에피토프에 대해 지시되도록 구축된 폴리펩티드에 관한 본 발명과 관련하여 본원에서 추가로 논의될 것이다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 만성 폐쇄성 폐 장애 또는 COPD 및 케모카인 수용체 CXCR2의 이상 기능과 연관된 다른 질환의 예방 또는 치료의 새로운 수단을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 추가의 목적은 면역요법인, COPD 및 CXCR2의 이상 기능과 연관된 다른 질환의 치료 또는 예방 수단을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 추가의 목적은 CXCR2 신호 전달의 길항제인 이뮤노글로불린 CDR을 포함하는 폴리펩티드를 제공하는 것이다.

**발명의 내용**

[0013] 본 발명은 2개의 이뮤노글로불린 항원 결합 도메인을 포함하고, 케모카인 수용체 CXCR2에 대해 지시되거나 또는 이에 결합하는 폴리펩티드이며, 여기서 제1 항원 결합 도메인은 CXCR2 상의 제1 에피토프를 인식하고, 제2 항원 결합 도메인은 CXCR2 상의 제2 에피토프를 인식하고, 상기 제1 항원 결합 도메인은 낙타류로부터 유래된 중쇄 항체의 단일 중쇄로부터의 제1 V<sub>H</sub> 도메인 또는 그의 단편 내에 포함하거나 또는 그의 서열-최적화 (인간화 포함)된 변이체이고, 상기 제2 항원 결합 도메인은 낙타류로부터 유래된 중쇄 항체의 단일 중쇄로부터의 제2 V<sub>H</sub> 도메인 또는 그의 단편 내에 포함되거나 또는 그의 서열-최적화 (인간화 포함)된 변이체이고, 폴리펩티드의 C-말단은 하나 이상의 추가의 아미노산 잔기의 항원 결합 도메인의 서열에 대한 연장부를 포함하는 것인 폴리펩티드에 관한 것이다. 본 발명의 바람직한 폴리펩티드는 서열 7에 제시된 아미노산의 서열로 이루어진 선형 펩티드에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인 및 상기 선형 펩티드에 결합할 수 없거나 또는 이에 보다 낮은 친화도로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 서열 7은 인간 CXCR2의 처음 19개의 N-말단 아미노산이다. 본 발명의 바람직한 폴리펩티드는 이중과라토프성이다. 본원에 사용된 용어 "이중과라토프성"은 폴리펩티드가

동일한 단백질 표적 상의 2개의 상이한 에피토프를 인식하는 2개의 항원 결합 도메인을 포함한다는 것을 의미한다. 그러나, 양쪽 이중- 또는 다중 파라토프성 및 다가, 즉 하나 이상의 다른 표적 단백질을 인식하는 항원 결합 도메인을 또한 갖는 폴리펩티드와 같이, 다중 파라토프성인, 즉 동일한 표적 단백질 상의 3개, 4개 또는 그 초과에 에피토프를 인식하는 항원 결합 도메인을 함유하는 폴리펩티드가 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0014] 본 발명의 바람직한 폴리펩티드에서, 제1 항원 결합 도메인을 포함하는 아미노산 서열 및 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 아미노산 서열은 링커 영역에 의해 연결된다. 본원에 보다 상세히 논의되는 바와 같이, 링커는 이뮤노글로불린 기원이거나 또는 그렇지 않을 수 있지만, 바람직하게는 펩티드이다.

[0015] 낙타류로부터 수득가능한 유형의 중쇄 단독 항체로부터의 아미노산의 V<sub>H</sub> 서열 또는 그의 단편 또는 변이체를 갖는 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인은 대안적으로 "V<sub>H</sub> 도메인" 또는 그의 단편 또는 "나노바디"로서 본원에서 지칭될 수 있다. 나노바디(Nanobody)<sup>®</sup>, 나노바디스(Nanobodies)<sup>®</sup> 및 나노클론(Nanoclone)<sup>®</sup>은 अब्ल린크스 N.V.(Ablynx N.V.)의 등록 상표임을 유의하여야 한다.

[0016] 본 발명의 폴리펩티드에서, 각각의 항원 결합 도메인은 본원에 규정된 하나 이상의 CDR, 바람직하게는 2 또는 3개의 CDR을 포함한다. 본 발명의 바람직한 폴리펩티드에서, 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인의 바람직한 구조는 하기 구조를 갖는 V<sub>H</sub> 도메인 또는 나노바디의 것이다:

[0017] **FR-CDR-FR-CDR-FR-CDR-FR**

[0018] 여기서, CDR 및 FR은 본원에서 추가로 규정된다.

[0019] 본 발명에 따라 바람직한 이중파라토프성 나노바디는 하기 구조 중 하나를 갖는다:

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

[0020]

[0021] 여기서, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4가 제1 항원 결합 도메인을 포함하면 FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8은 제2 항원 도메인을 포함하고, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4가 제2 항원 도메인을 포함하면 FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8은 제1 항원 결합 도메인을 포함하고, HLE는 증가된 생체내 반감기를 제공하는 결합 단위이고, EXT는 하나 이상의 추가의 아미노산 잔기의 C-말단 연장부이다.

[0022] 상기 바람직한 이중파라토프성 나노바디의 단편 또는 변이체는 CDR 및 FR이 낙타류 기원인 실시양태 또는 FR 중 하나 이상이 하나 이상의 인간화 치환을 가지며 바람직하게는 완전 인간화된 것인 실시양태를 포함하는 본 발명에 포함된다.

[0023] 본 발명에 따른 특히 바람직한 이중파라토프성 나노바디는 본원에서 163D2/127D1, 163E3/127D1, 163E3/54B12, 163D2/54B12, 2B2/163E3, 2B2/163D2, 97A9/2B2 및 97A9/54B12로 지칭되는 것 (이는 하나 이상의 추가의 아미노산 잔기를 포함하는 C-말단 연장부를 추가로 가지며, 그의 아미노산 서열은 표 13에 제시됨), 및 특히 FR이 본원에 규정된 서열 최적화 아미노산 치환 및 예컨대 표 32에서 성분 나노바디에 대해 제시된 것을 포함하는 그의 변이체이다.

[0024] 본 발명에 따른 추가의 특히 바람직한 이중파라토프성 나노바디는 표 33에 제시된 것이며, 이는 하나 이상의 추가의 아미노산 잔기를 포함하는 C-말단 연장부를 추가로 갖는다.

[0025] 본 발명의 바람직한 폴리펩티드는 서열 1 (CXCR2)의 아미노산 F11, F14 및 W15를 포함하는 에피토프에 결합한다. 본 발명의 바람직한 이중파라토프성 폴리펩티드, 예컨대 이중파라토프성 나노바디에서, 제2 항원 결합 도메인은 인간 CXCR2의 외부 루프 (서열 1의 아미노산 잔기 106-120, 184-208 및 274-294) 내의 에피토프에

결합한다. 본 발명의 한 실시양태에서 상기 에피토프는 입체형태적이다. 본 발명의 실시양태에서 상기 에피토프는 서열 1의 아미노산 잔기 W112, G115, I282 및 T285를 포함한다.

[0026] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 임의의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자 뿐만 아니라 그의 단편을 코딩하는 핵산, 예컨대 이중과라토프성 나노바디 내에 포함되는 개별 나노바디를 코딩하는 핵산을 포괄한다. 본 발명의 핵산을 포함하는 벡터 및 상기 벡터를 포함하고 본 발명에 따른 폴리펩티드를 발현할 수 있는 숙주 세포가 또한 본 발명에 포괄된다.

[0027] 또 다른 측면에서 본 발명은 본 발명에 따른 폴리펩티드를 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 폴리펩티드가 CXCR2의 활성을 차단하거나, 억제하거나 또는 감소시킬 수 있기 때문에, 이들은 CXCR2로부터의 이상 신호 전달이 역할을 수행하는 질환의 치료에 유용하다. 이러한 질환은 아테롬성동맥경화증, 사구체신염, 염증성 장 질환 (크론병), 혈관신생, 다발성 경화증, 건선, 피저성 농피증, 연령-관련 황반 변성 질환, 안구 베체트병, 포도막염, 비소세포 암종, 결장암, 췌장암, 식도암, 흑색종, 간세포성 암종 또는 허혈 관류 손상을 포함할 수 있다. 이러한 질환은 또한 기도의 상태, 예컨대 만성 섬유증, 천식, 중증 천식, 천식의 악화, 알레르기성 천식, 호중구성 천식, 급성 폐 손상, 급성 호흡 곤란 증후군, 특발성 폐 섬유증, 기도 재형성, 폐쇄성 세기관지염 증후군 또는 기관지폐 이형성증을 포함할 수 있다.

[0028] 한 실시양태에서 본 발명의 폴리펩티드는 천식, 특히 중증 천식 및 천식의 악화를 치료하는데 사용하기 위한 것이다.

[0029] 특히 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드는 백혈구, 특히 호중구의 폐 유조직으로의 이동 (이 이동은 CXCR2 신호전달을 통해 매개됨) 및 그의 후속적 파괴를 특징으로 하는 만성 폐쇄성 폐 장애 (COPD) 또는 COPD의 악화를 치료하는데 사용하기 위한 것이다. 본 발명의 폴리펩티드는 CXCR2 활성을 차단하거나, 억제하거나 또는 감소시키는 능력으로 인해 이러한 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 탁월한 후보가 된다.

[0030] 인간의 치료를 위해, 본 발명의 폴리펩티드는 인간 CXCR2에 대해 지시되거나 또는 그에 특이적으로 결합하는 것이 바람직하다. 그러나, 적절한 독성 시험을 시노물구스 원숭이에서 수행할 수 있기 위해서는 상기 폴리펩티드가 영장류 CXCR2, 특히 상기 원숭이 CXCR2와 교차-반응할 수 있는 경우가 바람직하다. 본 발명의 폴리펩티드는 수의학적 용도가 고려되는 경우에 다른 종으로부터의 CXCR2 상동체에 대해 지시되거나 또는 그에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0031] 본 발명의 다른 측면은 본원에서 추가의 논의로부터 분명해질 것이다.

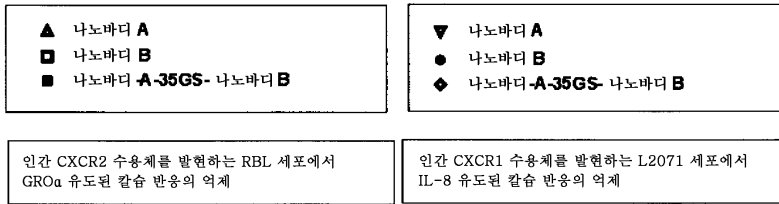
**도면의 간단한 설명**

[0032] 도 1은 효능제 Gro-α로 자극된 CHO-CXCR2 막으로부터의 [<sup>35</sup>S]GTP γS 방출을 차단하는 2개의 나노바디 및 본 발명의 이중과라토프성 나노바디의 능력을 증가하는 농도의 나노바디에서 측정된 경우에 수득한 반응 곡선을 보여준다.

도 1a는 나노바디 54B12 (표 9의 서열 90)의 결과를 보여주고, 도 1b는 나노바디 163E3 (표 9의 서열 42)의 결과를 보여주고, 도 1c는 이중과라토프성 나노바디 54B12/163E3 (표 13의 서열 68)의 결과를 보여준다.

도 2는 다양한 농도의 GRO-α에서 나노바디 농도에 대한 억제 %로서, GRO-α의 억제에 의한 2개의 대표적인 나노바디 127D1 (도 2a), 163E3 (도 2b) 및 이중과라토프성 163E3-35GS-127D1 (도 2c)의 효력 및 효능을 보여준다. 127D1은 강력하지만 효과적이지 않은 것으로 보이는 반면, 163E3은 보다 낮은 효력을 갖지만 127D1보다 효과적이다. 2개의 결합 분자를 합한 경우에, 생성된 이중과라토프성 결합 분자는 강력하고 효과적이고 둘 다인 것으로 밝혀졌다.

도 3은 하기 패널에 도시된 바와 같이 CXCR1과 비교하여 CXCR2에 대한 특이성에 대해 본 발명의 대표적인 폴리펩티드를 시험한 결과를 보여준다.



시험된 정제된 1가 항-CXCR2 (A 또는 B) 또는 이중과라토프성 나노바디는 GRO  $\alpha$ 에 반응하여 hCXCR2에 대한 nM 효력을 보여준 반면, hCXCR1 수용체 상에서는 이들이 세포내 칼슘의 IL-8-유도된 방출에 반응하여  $\mu$ M 농도에서 활성이었다.

도 4는 AA C-말단 연장부를 갖는 이중과라토프성 반감기 연장된 나노바디 79-76-A1b8-AA가 항-Nb IgG 반응성을 남성에서는 50%에서 20%로 및 여성에서는 61%에서 16%로 유의하게 감소시켰다는 것을 보여준다. 또한, Ala-Ala C-말단 변이체 79-76-A1b8-AA 및 79-86-A1b8-AA는 C-말단 연장부를 갖지 않는 나노바디 79-76-A1b8 및 79-86-A1b8과 비교한 경우에 기능적 활성을 변경시키지 않았다.

도 5는 rhGRO- $\alpha$ 에 대한 1차 인간 호중구의 화학주성에 대한 항-CXCR2 나노바디, 79-76-A1b8-AA의 효과를 보여 준다. 칼세인-AM으로 표지된 단리된 1차 인간 호중구를 RT에서 30분 동안 변화하는 농도의 항-CXCR2 나노바디, 79-76-A1b8-AA (●)와 예비인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 3  $\mu$ m 다중웰 삽입물에 첨가하고, 수용자 플레이트에서 2 nM rhGRO- $\alpha$ 에 대한 화학주성이 90분 동안 37°C에서 일어나도록 허용하였다. 이어서, 수용자 플레이트의 웰로 이동한 세포로부터의 형광을 485 nm 여기 및 520 nm 방출에서 바이오텍 시너지(BioTek Synergy) 플레이트 판독기 상에서 측정하였다. 79-76-A1b8-AA는 rhGRO- $\alpha$ -자극된 화학주성을  $0.256 \pm 0.02$  nM (n=4 공여자로부터의 평균  $\pm$  SEM)의 IC<sub>50</sub> 값으로 억제하였다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0033] 정의

[0034] 본 명세서, 실시예 및 청구의 범위에서:

[0035] a) 달리 나타내거나 규정되지 않는 한, 사용되는 모든 용어는 당업계에서 그의 통상의 의미를 갖고, 이는 당업자에게 명백할 것이다. 예를 들어, 다음과 같이 하기 언급되는 표준 안내서를 참조한다. 문헌 [Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd.Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel et al., eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, New York, N.Y., (1985); Old et al., "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", 2nd edition, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt et al., "Immunology" (6th. Ed.), Mosby/Elsevier, Edinburgh (2001); Roitt et al., Roitt' s Essential Immunology, 10 Ed. Blackwell Publishing, UK (2001); 및 Janeway et al., "Immunobiology" (6th Ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York (2005)].

[0036] b) 달리 나타내지 않는 한, 용어 "이뮤노글로불린" 또는 "이뮤노글로불린 서열"은 - 본원에서 중쇄 항체를 지칭하도록 사용되는지 또는 종래의 4쇄 항체를 지칭하도록 사용되는지와 관계없이 - 전장 항체, 그의 개별 쇠 둘 다 뿐만 아니라 그의 모든 부분, 도메인 또는 단편 (각각 항원-결합 도메인 또는 단편, 예컨대 V<sub>H</sub> 도메인 또는 V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> 도메인을 포함하나 이로 제한되지는 않음)을 포함하는 일반적 용어로서 사용된다. 또한, 본원에서 사용되는 용어 "서열" (예를 들어, "이뮤노글로불린 서열", "항체 서열", "가변 도메인 서열", "V<sub>H</sub> 서열" 또는 "단백질 서열"과 같은 용어에서)은 문맥상 보다 제한된 해석이 필요하지 않는 한 일반적으로 관련 아미노산 서열 뿐만 아니라 이를 코딩하는 핵산 서열 또는 뉴클레오티드 서열을 둘 다 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0037] c) 달리 나타내지 않는 한, 용어 "이뮤노글로불린 단일 가변 도메인"은 각각 항원-결합 도메인 또는 단편, 예컨대 V<sub>H</sub> 도메인 또는 V<sub>H</sub> 또는 V<sub>L</sub> 도메인을 포함하나 이에 제한되지는 않는 일반적 용어로서 사용된다. 용어 항원-결합 분자 또는 항원-결합 단백질은 교환가능하게 사용되고, 용어 나노바디를 또한 포함한다. 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인은 추가로 경쇄 가변 도메인 서열 (예를 들어, V<sub>L</sub>-서열), 또는 중쇄 가변 도메인 서열 (예를

들어,  $V_H$  서열)이고; 보다 구체적으로, 종래의 4쇄 항체로부터 유래된 중쇄 가변 도메인 서열 또는 중쇄 항체로부터 유래된 중쇄 가변 도메인 서열일 수 있다. 따라서, 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인은 도메인 항체, 또는 도메인 항체로서 사용하기 적합한 이뮤노글로불린 서열, 단일 도메인 항체, 또는 단일 도메인 항체로서 사용하기 적합한 이뮤노글로불린 서열, "dAb" 또는 dAb로서 사용하기 적합한 이뮤노글로불린 서열, 또는  $V_{HH}$  서열을 포함하나 이에 제한되지는 않는 나노바디일 수 있다. 본 발명은 마우스, 래트, 토끼, 당나귀, 인간 및 낙타류 이뮤노글로불린 서열을 포함하는 상이한 기원의 이뮤노글로불린 서열을 포함한다. 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인은 완전 인간, 인간화, 달리 서열 최적화된 또는 키메라 이뮤노글로불린 서열을 포함한다. 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 및 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인의 구조는 당업계 및 본원에서 "프레임워크 영역 1" 또는 "FR1"로; "프레임워크 영역 2" 또는 "FR2"로; "프레임워크 영역 3" 또는 "FR3"으로; 및 프레임워크 영역 4" 또는 "FR4"로 각각 언급되는 "FR"의 4개의 프레임워크 영역으로 이루어지는 것으로 간주될 수 있고 (그러나, 이에 제한되지는 않음); 여기서 프레임워크 영역에는 당업계에서 "상보성 결정 영역 1" 또는 "CDR1"로; "상보성 결정 영역 2" 또는 "CDR2"로; 및 "상보성 결정 영역 3" 또는 "CDR3"으로 각각 언급되는 3개의 상보성 결정 영역 또는 "CDR"이 개재한다.

[0038] d) 달리 나타내지 않는 한, 상세한 설명에 구체적으로 기재되지 않은 모든 방법, 단계, 기술 및 조작은, 당업자에게 명백한 바와 같이 그 자체로 공지된 방식으로 수행될 수 있고 수행되어 왔다. 예를 들어 표준 안내서 및 본원에 언급되는 일반적 배경 기술 및 본원에 인용된 추가의 참고문헌; 뿐만 아니라 예를 들어 단백질 조작 기술, 예컨대 친화도 성숙 및 단백질, 예컨대 이뮤노글로불린의 특이성 및 다른 목적하는 특성을 개선하기 위한 다른 기술을 기재하고 있는 다음 문헌을 참조한다: 문헌 [Presta, Adv. Drug Deliv. Rev. 2006, 58 (5-6): 640-56; Levin and Weiss, Mol. Biosyst. 2006, 2(1): 49-57; Irving et al., J. Immunol. Methods, 2001, 248(1-2), 31-45; Schmitz et al., Placenta, 2000, 21 Suppl. A, S106-12, Gonzales et al., Tumour Biol., 2005, 26(1), 31-43].

[0039] e) 아미노산 잔기는 표준 3-문자 또는 1-문자 아미노산 코드에 따라 표시될 것이다.

[0040] f) 2개 이상의 뉴클레오티드 서열을 비교하는 목적을 위해, 제1 뉴클레오티드 서열과 제2 뉴클레오티드 서열 사이의 "서열 동일성" 백분율은 [제2 뉴클레오티드 서열 내의 상응하는 위치에서 뉴클레오티드에 동일한 제1 뉴클레오티드 서열 내의 뉴클레오티드의 수]를 [제1 뉴클레오티드 서열 내의 뉴클레오티드의 총 수]로 나누고 [100%]를 곱함으로써 (여기서, 제2 뉴클레오티드 서열 내의 뉴클레오티드의 각각의 결실, 삽입, 치환 또는 부가 - 제1 뉴클레오티드 서열에 비해 -는 단일 뉴클레오티드 (위치)에서의 차이로서 간주됨); 또는 적합한 컴퓨터 알고리즘 또는 기술을 이용하여 계산하거나 결정될 수 있다. 2개 이상의 뉴클레오티드 서열 사이의 서열 동일성 정도는 표준 설정을 사용하여 서열 정렬을 위한 공지의 컴퓨터 알고리즘, 예컨대 NCBI Blast v2.0을 사용하여 계산될 수 있다. 서열 동일성 정도를 결정하기 위한 일부 다른 기술, 컴퓨터 알고리즘 및 설정은 예를 들어 WO 04/037999, EP 0 967 284, EP 1 085 089, WO 00/55318, WO 00/78972, WO 98/49185 및 GB 2 357 768-A에 기재되어 있다. 대체로, 본원에 개략적으로 설명된 계산 방법에 따라 2개의 뉴클레오티드 서열 사이의 "서열 동일성" 백분율을 결정하기 위해, 최대 수의 뉴클레오티드를 갖는 뉴클레오티드 서열은 "제1" 뉴클레오티드 서열로 간주되고, 다른 뉴클레오티드 서열은 "제2" 뉴클레오티드 서열로 간주될 것이다.

[0041] g) 2개 이상의 아미노산 서열을 비교하는 목적을 위해, 제1 아미노산 서열과 제2 아미노산 서열 사이의 "서열 동일성" 백분율 (본원에서 또한 "아미노산 동일성"으로 언급됨)은 [제2 아미노산 서열 내의 상응하는 위치에서 아미노산 잔기에 동일한 제1 아미노산 서열 내의 아미노산 잔기의 수]를 [제1 아미노산 서열 내의 아미노산 잔기의 총수]로 나누고 [100%]를 곱함으로써 (여기서, 제2 아미노산 서열 내의 아미노산 잔기의 각각의 결실, 삽입, 치환 또는 부가 - 제1 아미노산 서열에 비해 -는 단일 아미노산 잔기 (위치)에서의 차이, 즉 본원에 규정된 "아미노산 차이"로서 간주됨); 또는 적합한 컴퓨터 알고리즘 또는 기술을 이용하여 계산하거나 결정될 수 있다. 본원에 개략적으로 설명된 계산 방법에 따라 2개의 아미노산 서열 사이의 "서열 동일성" 백분율을 결정하기 위해, 최대 수의 아미노산 잔기를 갖는 아미노산 서열은 "제1" 아미노산 서열로 간주되고, 다른 아미노산 서열은 "제2" 아미노산 서열로 간주될 것이다.

[0042] 또한, 2개의 아미노산 서열 사이의 서열 동일성 정도를 결정할 때, 당업자는 아래 v)에 개시된 바와 같이 소위 "보존적" 아미노산 치환을 고려할 수 있다.

[0043] 본원에 기재된 폴리펩티드에 적용되는 임의의 아미노산 치환은 문헌 [Schulz et al., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1978]에 의해 개발된, 상이한 종의 상동성 단백질 사이의 아미노산 변이의 빈도의 분석, 문헌 [Chou and Fasman, Biochemistry 13: 211, 1974 및 Adv. Enzymol., 47: 45-149, 1978]에 의해 개

발된 구조 형성 능력의 분석, 및 문헌 [Eisenberg et al., Proc. Nad. Acad Sci. USA 81: 140-144, 1984; Kyte & Doolittle; J Molec. Biol. 157: 105-132, 1981, 및 Goldman et al., Ann. Rev. Biophys. Chem. 15: 321-353, 1986]에 의해 개발된 단백질의 소수성 패턴 분석을 기초로 할 수 있고, 상기 문헌은 모두 그 전부가 본원에 참조로 포함된다. 나노바디의 1차 및 2차 구조에 대해, 라마로부터의 V<sub>H</sub> 도메인의 결정 구조는 예를 들어 문헌 [Desmyter et al., Nature Structural Biology, Vol. 3, 9, 803 (1996); Spinelli et al., Natural Structural Biology (1996); 3, 752-757; 및 Decanniere et al., Structure, Vol. 7, 4, 361 (1999)]에 제시되어 있다.

[0044] h) 2개의 아미노산 서열을 비교하는 경우에, 용어 "아미노산 차이"는 제2 서열에 비해 제1 서열의 위치 상의 단일 아미노산 잔기의 삽입, 결실 또는 치환을 지칭하고; 2개의 아미노산 서열은 1개, 2개 또는 그 초과와 이러한 아미노산 차이를 함유할 수 있는 것으로 이해된다.

[0045] i) 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열이 각각 또 다른 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열을 "포함한다", 또는 "본질적으로 또 다른 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열로 이루어진다"고 언급되는 경우에, 이는 후자의 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열이 각각 먼저 언급된 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열 내로 도입되었음을 의미할 수 있지만, 보다 통상적으로 이는 일반적으로 먼저 언급된 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열이 그의 서열 내에, 먼저 언급된 서열이 어떻게 실제로 생성되는지 또는 수득되는지에 관계없이 (예를 들어, 본원에 기재된 임의의 적합한 방법에 의할 수 있음), 후자의 서열과 동일한 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열을 각각 갖는 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기의 스트레치를 각각 포함한다는 것을 의미한다. 비제한적 예로서, 본 발명의 이중과라토프성 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인, 예를 들어 나노바디가 CDR 서열을 포함하는 것으로 언급되는 경우에, 이는 상기 CDR 서열이 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 내로 도입되었음을 의미할 수 있지만, 보다 통상적으로 이는 일반적으로 본 발명의 이중과라토프성 나노바디가 그의 서열 내에, 상기 이중과라토프성 나노바디가 대체로 생성되는지 또는 수득되는지에 관계없이, 상기 CDR 서열과 동일한 아미노산 서열을 각각 갖는 아미노산 잔기의 스트레치를 각각 포함한다는 것을 의미한다. 또한, 후자의 아미노산 서열이 특이적인 생물학적 또는 구조적 기능을 갖는 경우에, 이는 바람직하게는 먼저 언급된 아미노산 서열에 본질적으로 동일한, 유사한 또는 동등한 생물학 또는 구조적 기능을 갖는다는 것에 유의하여야 한다 (즉, 먼저 언급된 아미노산 서열은, 후자의 서열이 본질적으로 동일한, 유사한 또는 동등한 생물학 또는 구조적 기능을 수행할 수 있도록 하는 것이 바람직함). 예를 들어, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디가 각각 CDR 서열 또는 프레임워크 서열을 포함하는 것으로 언급되는 경우에, CDR 서열 및 프레임워크는 바람직하게는 상기 이중과라토프성 나노바디에서 각각 CDR 서열 또는 프레임워크 서열로서 기능할 수 있다. 또한, 뉴클레오티드 서열이 또 다른 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것으로 언급되는 경우에, 먼저 언급된 뉴클레오티드 서열이 바람직하게는 발현 생성물 (예를 들어, 폴리펩티드)로 발현될 때, 후자의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열은 상기 발현 생성물의 일부를 형성하도록 하는 것이다 (즉, 후자의 뉴클레오티드 서열은 먼저 언급된 더 큰 뉴클레오티드 서열과 동일한 리딩 프레임으로 존재함).

[0046] j) 핵산 서열 또는 아미노산 서열은 통상적으로 그의 공급원 또는 배지에 연관되는 하나 이상의 다른 성분, 예컨대 또 다른 핵산, 또 다른 단백질/폴리펩티드, 또 다른 생물학적 성분 또는 거대분자 또는 하나 이상의 오염물, 불순물 또는 소수의 성분으로부터 분리되는 경우에 - 예를 들어, 그 서열이 얻어지는 그의 천연 생물학적 공급원 및/또는 반응 매질 또는 배양 배지에 비해 - "본질적으로 단리된 (형태로 존재하는)" 것으로 간주된다. 특히, 핵산 서열 또는 아미노산 서열은 2배 이상, 특히 10배 이상, 보다 특히 100배 이상, 및 최대 1000배 또는 그 초과로 정제될 경우 "본질적으로 단리된" 것으로 간주된다. "본질적으로 단리된 형태"로 존재하는 핵산 서열 또는 아미노산 서열은 바람직하게는 적합한 기술, 예컨대 적합한 크로마토그래피 기술, 예컨대 폴리아크릴아미드-겔 전기영동을 사용하여 결정되는 경우에 본질적으로 균일하다.

[0047] k) 본원에 사용된 용어 "항원 결합 도메인"은 하나 이상의 CDR을 포함하고 표적 항원 결정기 또는 에피토프를 인식하는 입체형태인 이뮤노글로불린 내의 아미노산 서열을 지칭한다.

[0048] l) 또한 본원에서 교환가능하게 사용될 수 있는 용어 "항원 결정기" 및 "에피토프"는 선형 입체형태인지 또는 비-선형 입체형태인지 여부와 관계없이 항원 결합 도메인에 의해 인식되는 표적 CXCR2 내의 아미노산 서열을 지칭한다.

[0049] m) 특이적 항원 결정기, 에피토프, 항원 또는 단백질 (또는 그의 하나 이상의 부분, 단편 또는 에피토프)에 (특이적으로) 결합할 수 있고/있거나 친화도를 갖고/갖거나 특이성을 갖는 본 발명의 폴리펩티드, 예컨대 본원에 기재된 이중과라토프성 나노바디 또는 그의 단편은 상기 항원 결정기, 에피토프, 항원 또는 단백질"에 대한" 것

또는 "에 대해 지시되는" 것으로 언급된다.

- [0050] n) 용어 "특이성"은 본 발명의 폴리펩티드의 특정한 항원-결합 도메인이 결합할 수 있는 상이한 유형의 항원 또는 항원 결정기의 수를 지칭한다. 임의의 특정한 항원/에피토프에 대한 항원-결합 단백질의 특이성은 또한 폴리펩티드와 관련 항원 또는 에피토프 사이의 결합을 측정하기 위한 일부 바람직한 기술을 기재하고 있는 WO 08/020079 (본원에 참조로 포함됨)의 53-56 페이지에 기재된 바와 같이 친화도 및/또는 결합력을 기초로 하여 결정될 수 있다. 전형적으로, 각각의 항원-결합 단백질 (예컨대, 본 발명의 폴리펩티드)에서 각각의 항원 결합 도메인은 각각 독립적으로  $10^{-5}$  내지  $10^{-12}$  몰/리터 이하, 바람직하게는  $10^{-7}$  내지  $10^{-12}$  몰/리터 이하, 보다 바람직하게는  $10^{-8}$  내지  $10^{-12}$  몰/리터의 해리 상수 ( $K_D$ ) (즉,  $10^5$  내지  $10^{12}$  리터/몰 이상, 바람직하게는  $10^7$  내지  $10^{12}$  리터/몰 이상, 보다 바람직하게는  $10^8$  내지  $10^{12}$  리터/몰의 회합 상수 ( $K_A$ ))로 그의 항원/에피토프에 결합할 수 있다.  $10^4$  몰/리터 초과와 임의의  $K_D$  값 (또는  $10^4 \text{ M}^{-1}$  미만의 임의의  $K_A$  값)이 일반적으로 비-특이적 결합을 나타내는 것으로 간주된다. 바람직하게는, 본 발명의 이중파라토프성 폴리펩티드는 목적하는 항원에 500 nM 미만, 바람직하게는 200 nM 미만, 보다 바람직하게는 10 nM 미만, 예컨대 500 pM 미만의 친화도로 결합할 것이다. 본 발명의 폴리펩티드의 CXCR2에 대한 특이적 결합은 예를 들어 스캐차드(Scatchard) 분석 및/또는 경쟁적 결합 검정, 예컨대 방사성면역검정 (RIA), 효소 면역검정 (EIA) 및 샌드위치 경쟁 검정, 및 당업계에 공지된 그의 상이한 변형 방법; 뿐만 아니라 본원에 언급된 다른 기술을 포함하는 그 자체로 공지된 임의의 적합한 방식으로 결정될 수 있다. 당업자에게 명백하고 WO 08/020079의 53-56 페이지에 기재된 바와 같이, 해리 상수는 실제 또는 겉보기 해리 상수일 수 있다. 해리 상수를 결정하는 방법은 당업자에게 명백할 것이고, 예를 들어 WO 08/020079의 53-56 페이지에 언급된 기술을 포함한다.
- [0051] o) 본 발명의 폴리펩티드, 특히 본 발명에 따른 이중파라토프성 나노바디의 반감기는 일반적으로 본 발명의 폴리펩티드의 혈청 농도가, 예를 들어 폴리펩티드의 분해 및/또는 자연 메카니즘에 의한 폴리펩티드의 클리어런스 또는 제거에 의해 생체내에서 50% 감소하는데 걸리는 시간으로서 규정될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드의 생체내 반감기는 그 자체로 공지된 임의의 방식으로, 예컨대 약동학 분석에 의해 결정될 수 있다. 적합한 기술은 당업자에게 명백할 것이고, 예를 들어 일반적으로 WO 08/020079의 57 페이지의 단락 o)에 기재된 것일 수 있다. 또한 WO 08/020079의 57 페이지에서 언급된 바와 같이, 반감기는 파라미터, 예컨대  $t_{1/2}$ -알파,  $t_{1/2}$ -베타 및 곡선하 면적 (AUC)을 사용하여 표현될 수 있다. 예를 들어 아래 실험 부분, 및 표준 안내서, 예컨대 문헌 [Kenneth, A et al.: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and Peters et al., Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996)]을 참조한다. 또한, 문헌 ["Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, published by Marcel Dekker, 2nd Rev. edition (1982)]을 참조한다. 용어 "반감기의 증가" 또는 "증가된 반감기"는  $t_{1/2}$ -알파 및/또는 AUC 또는 둘 다의 증가의 존재 또는 부재 하에  $t_{1/2}$ -베타의 증가를 의미한다.
- [0052] p) 본 발명의 문맥에서, 적합한 시험관내, 세포 또는 생체내 검정을 이용하여 측정시에 CXCR2의 활성을 "차단하거나, 감소시키거나 또는 억제하는" 것은 동일하지만 본 발명의 폴리펩티드는 존재하지 않는 조건 하의 동일한 검정에서의 CXCR2 활성에 비해, CXCR2의 관련 또는 의도되는 생물학적 활성의 활성을 1% 이상, 바람직하게는 5% 이상, 예컨대 10% 이상 또는 25% 이상, 예를 들어 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상 차단하거나, 감소시키거나 억제하는 것을 의미할 수 있다.
- [0053] 당업자에게 명백하게 되는 바와 같이, 억제는 또한 그의 리간드 또는 결합 파트너 중 하나 이상에 대한 CXCR2의 친화도, 결합력, 특이성 및/또는 선택성의 감소에 영향을 미치는 것 및/또는 동일하지만 본 발명의 폴리펩티드가 존재하지 않는 조건에 비해 CXCR2가 존재하는 배지 또는 주변의 하나 이상의 조건 (예컨대, pH, 이온 강도, 보조-인자의 존재 등)에 대한 CXCR2의 감수성의 감소에 영향을 미치는 것을 포함할 수 있다. 당업자에게 명백하게 되는 바와 같이, 이는 다시 관련되는 표적 또는 항원에 따라 임의의 적합한 방식으로 및/또는 그 자체로 공지된 임의의 적합한 분석을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0054] q) 본원에 사용된 "조절하는"은 CXCR2의 알로스테릭 조절; 및/또는 그의 리간드 중 하나에 대한 CXCR2의 결합의 감소 또는 억제 및/또는 CXCR2에의 결합에 대한 천연 리간드와의 경쟁을 의미할 수 있다. 또한, 조절하는 것은 예를 들어 CXCR2의 폴딩 또는 입체형태에 대한 또는 그의 입체형태를 변화시키는 (예를 들어, 리간드의 결합시에), 다른 (하위)단위와 회합하는, 또는 해리하는 그의 능력에 대한 변화의 초래를 수반할 수 있다. 또한, 조절하는 것은 예를 들어 다른 화합물을 수송하거나 또는 다른 화합물 (예컨대, 이온)에 대한 채널로서 기능하는

CXCR2의 능력의 변화의 초래를 수반할 수 있다.

- [0055] 본 발명의 폴리펩티드, 특히 본 발명의 이중과라토프성 나노바디에 의한 CXCR2 활성의 조절, 특히 억제 또는 감소는 가역적 또는 비가역적일 수 있지만, 제약 및 약리학적 목적을 위해 통상적으로 가역적 방식일 것이다.
- [0056] r) 본 발명의 폴리펩티드는 제2 표적 또는 폴리펩티드에 결합하는 친화도보다 10배 이상, 예컨대 100배 이상, 바람직하게는 1000배 이상, 및 최대 10,000배 또는 그 초과 친화도 (상기 기재된 바와 같이, 및  $K_D$  값,  $K_A$  값,  $K_{off}$  비율 및/또는  $K_{on}$  비율로 적합하게 표현됨)로 CXCR2에 결합하는 경우에 제2 표적 또는 항원에 비해 CXCR2에 "대해 특이적인" 것으로 언급된다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드는 또 다른 표적 또는 폴리펩티드 또는 그의 에피토프에 결합하는  $K_D$ 보다 10배 이상 작은, 예컨대 100배 이상 작은, 바람직하게는 1000배 이상 작은, 예컨대 10,000배 작은 또는 심지어 이보다 더 작은  $K_D$  값으로 CXCR2에 결합할 수 있다.
- [0057] s) 용어 "교차-차단하다", "교차-차단된" 및 "교차-차단하는"은 제시된 표적에 대한 본 발명의 다른 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드의 결합을 저해하는 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드의 능력을 의미하도록 본원에서 교환가능하게 사용된다. 본 발명의 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드가 또 다른 표적의 결합을 저해하고 따라서 본 발명에 따라 교차-차단하는 것으로 언급될 수 있는 정도는 경쟁 결합 검정을 사용하여 결정될 수 있다. 특히 적합한 한 정량적 교차-차단 검정은 표적에 대한 그의 결합의 측면에서 본 발명에 따른 표지된 (예를 들어, His-태그부착된, 방사성 또는 형광 표지된) 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드와 다른 결합제 사이의 경쟁을 측정하는 FACS- 또는 ELISA-기반 접근법을 이용한다. 실험 부분은 결합 분자가 본 발명에 따른 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드를 교차-차단하거나 교차-차단할 수 있는지를 결정하기 위한 적합한 FACS- 및 ELISA-대체-기반 검정을 일반적으로 기재한다. 검정은 본원에 기재된 임의의 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 또는 다른 결합제와 함께 사용될 수 있음이 이해될 것이다. 따라서, 일반적으로, 본 발명에 따른 교차-차단 아미노산 서열 또는 다른 결합제는 검정 동안 제2 아미노산 서열 또는 본 발명의 다른 결합제의 존재 하에 본 발명에 따른 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드의 기록된 대체가, 시험되는 잠재적 교차-차단제 (예를 들어, 다른 항체 단편,  $V_H$ , dAb 또는 유사한  $V_H/V_L$  변이체)에 의한 최대 이론적 대체의 50% 내지 100%가 되도록 상기 교차-차단 검정에서 표적에 결합하는 것이다.
- [0058] t) 본 발명에 따른 폴리펩티드는 2개의 상이한 항원 또는 항원 결정기 둘 다에 대해 (본원에 정의된 바와 같이) 특이적이면, 이들 상이한 항원 또는 항원 결정기 (예컨대, 포유동물의 2가지 상이한 종, 예컨대 인간 및 시노몰 구스 원숭이로부터의 혈청 알부민 또는 CXCR2)에 대해 "교차-반응성"인 것으로 언급된다.
- [0059] u) 본원에 규정된 바와 같이, 보존적 아미노산 변화는 아미노산 잔기가 유사한 화학 구조의 또 다른 아미노산 잔기로 교체되고 폴리펩티드의 기능, 활성 또는 다른 생물학적 특성에 대한 영향을 거의 또는 본질적으로 전혀 갖지 않는 아미노산 치환을 의미한다. 이러한 보존적 아미노산 치환은 예를 들어 WO 04/037999, GB-A-3 357 768, WO 98/49185, WO 00/46383 및 WO 01/09300으로부터 당업계에 공지되어 있고; 상기 치환의 (바람직한) 유형 및/또는 조합은 WO 04/037999 뿐만 아니라 WO 98/49185로부터 및 본원에 인용된 추가의 참고문헌으로부터의 관련 교시를 기초로 하여 선택될 수 있다.
- [0060] 이러한 보존적 치환은 바람직하게는 다음 군 (a) - (e) 내의 하나의 아미노산이 동일한 군 내의 또 다른 아미노산 잔기로 치환된 치환이다: (a) 작은 지방족, 비극성 또는 저극성 잔기: Ala, Ser, Thr, Pro 및 Gly; (b) 극성, 음으로 하전된 잔기 및 그의 (비하전된) 아미드: Asp, Asn, Glu 및 Gln; (c) 극성, 양으로 하전된 잔기: His, Arg 및 Lys; (d) 큰 지방족, 비극성 잔기: Met, Leu, He, Val 및 Cys; 및 (e) 방향족 잔기: Phe, Tyr 및 Trp.
- [0061] 특히 바람직한 보존적 치환은 다음과 같다: Ala → Gly 또는 → Ser; Arg → Lys; Asn → Gln 또는 → His; Asp → Glu; Cys → Ser; Gln → Asn; Glu → Asp; Gly → Ala 또는 → Pro; His → Asn 또는 → Gln; He → Leu 또는 → Val;
- [0062] Leu → He 또는 → Val; Lys → Arg, → Gln 또는 → Glu; Met → Leu, → Tyr 또는 → He; Phe → Met, → Leu 또는 → Tyr; Ser → Thr; Thr → Ser; Trp → Tyr; Tyr → Trp; 및/또는 Phe → Val, → He 또는 → Leu.
- [0063] v) 본원에 사용된 CDR은 본 발명의 폴리펩티드의 상보성 결정 영역이다. CDR은 단독으로 또는 하나 이상의 다른 CDR과 조합되어 본 발명의 폴리펩티드가 인식하는 항원(들) 또는 에피토프(들)와의 상보성을 확립하는 아미

노산의 스트레치이다. CDR은 특정 넘버링 규정에 의해 아미노산 서열에서 확인된다. 본원의 특허청구범위 및 구체적 설명에서, 카바트 넘버링이 사용된다.

- [0064] w) 본원에 사용된 FR은 프레임워크 영역 (때때로 FW로 지칭됨)이다. 프레임워크 영역은 하나 이상의 CDR에 인접하여 이를 항원 또는 에피토프 인식을 위한 정확한 3차원 입체형태로 지지하는 아미노산의 스트레치이다. FR은 표적 항원 또는 에피토프에 특이적이지 않지만, 이들이 존재하는 이뮤노글로불린 분자의 중 기원 또는 유형에 특이적이다. 본원에서 상세히 논의되는 바와 같이, 이뮤노글로불린의 공급원, 예를 들어 낙타류에 의해 적용되는 프레임워크 서열에 상이하도록 조작되는 프레임워크 영역의 아미노산 서열에 대한 범위가 본 발명의 폴리펩티드 내에 존재한다.
- [0065] x) 본원에 사용된 CXCR2는 적어도 백혈구의 표면 상에 존재하고 그에 대한 자연 발생 리간드가 Gro- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , IL-8, ENA-78 또는 GCP-2일 수 있는 시토카인 수용체를 지칭한다. CXCR2는 일반적으로 본원에서 유래하는 종과 관계없이 CXCR2 기능을 나타내는 임의의 단백질 또는 그의 임의의 대립유전자 변이체 또는 오르토로그를 지칭하고, 시노물구스 CXCR2는 서열 3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 단백질 또는 그의 임의의 대립유전자 변이체 또는 오르토로그를 지칭한다.
- [0066] y) 본원에 사용된 "서열-최적화"는 천연 서열 내에 존재하지 않을 수 있는 특정한 특성 또는 구조적 특성을 확보하기 위해 아미노산 서열 내의 치환, 삽입 또는 결실을 용이하게 하는 것을 지칭한다. 이러한 치환, 삽입 또는 결실은 예를 들어 화학적 안정화, 제조 능력의 개선, 피로글루타메이트 형성 또는 산화 또는 이성질체화의 방지를 위해 수행될 수 있다. 본 발명의 이중파라토프성 폴리펩티드, 특히 이중파라토프성 나노바디에 이용될 수 있는, 상기 특성의 최적화를 달성하기 위한 방법은 본원에 참조로 포함된 WO 2009/095235에 기재되어 있다. 또한, 서열 최적화 기술은 본 발명의 이중파라토프성 폴리펩티드를 본원에 기재된 방식으로 인간화하기 위해 수행될 수 있다. 따라서, 서열 최적화, 서열 최적화되는 또는 서열-최적화된 것이 본원에 사용되는 경우에, 이는 인간화 치환 또는 삽입에 대한 구체적인 언급 및 부분적으로 또는 완전히 인간화된 이중파라토프성 폴리펩티드, 바람직하게는 이중파라토프성 나노바디를 포괄한다.
- [0067] z) 본원에 사용된 "C-말단 연장부"는 폴리펩티드 쇠의 C-말단에 부가된 아미노산 잔기를 지칭한다. 이러한 연장은 1개 이상, 바람직하게는 2개 이상의 아미노산 잔기 길이이고, 다르게는 일부 개체의 혈청에서 발견된 IgG 분자와 상호작용할 수 있을지도 모르는 에피토프를 감추는 기능을 한다.
- [0068] 발명의 상세한 설명
- [0069] 제1 측면에서 본 발명은 2개의 이뮤노글로불린 항원 결합 도메인을 포함하고, 케모카인 수용체 CXCR2에 대해 지시되거나 또는 이에 결합하는 폴리펩티드이며, 여기서 제1 항원 결합 도메인은 CXCR2 상의 제1 에피토프를 인식하고, 제2 항원 결합 도메인은 CXCR2 상의 제2 에피토프를 인식하고, 상기 제1 항원 결합 도메인은 낙타류로부터 유래된 중쇄 항체의 단일 중쇄로부터의 제1  $V_{H1}$  도메인 또는 그의 단편 내에 포함하거나 또는 그의 서열-최적화 (인간화 포함)된 변이체이고, 상기 제2 항원 결합 도메인은 낙타류로부터 유래된 중쇄 항체의 단일 중쇄로부터의 제2  $V_{H2}$  도메인 또는 그의 단편 내에 포함되거나 또는 그의 서열-최적화 (인간화 포함)된 변이체이고, 폴리펩티드의 C-말단은 하나 이상의 추가의 아미노산 잔기의 항원 결합 도메인의 서열에 대한 연장부를 포함하는 것인 폴리펩티드를 제공한다.
- [0070] 본원에 개시된 모든 실시양태는 상기 언급된 항원 결합 도메인에 대한 C-말단 연장부를, 이것이 임의의 주어진 실시양태에 대해 구체적으로 논의되든지 또는 논의되지 않든지에 관계없이 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 본 발명의 폴리펩티드는 모두 이러한 C-말단 연장부를 포함한다.
- [0071] 본 발명의 바람직한 폴리펩티드는 서열 7에 제시된 아미노산의 서열로 이루어지는 선형 펩티드에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인 및 상기 선형 펩티드에 결합할 수 없거나 또는 보다 낮은 친화도로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다. 서열 7은 인간 CXCR2의 처음 19개의 N-말단 아미노산이다.
- [0072] 한 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 CXCR2의 아미노산 1 내지 19를 포함하거나 그 내의 제1 에피토프를 인식하고, 상기 제2 항원 결합 도메인은 아미노산 1 내지 19 외부의 CXCR2 상의 제2 에피토프를 인식한다.
- [0073] 중쇄 항체의 단일 쇠의 가변 영역은  $V_{H1}$  도메인으로 알려져 있고, 나노바디로서 공지된 항체 단편을 포함한다. 나노바디는 전체  $V_{H1}$  도메인 또는 그의 단편을 포함할 수 있다. 중쇄 항체 및 그의 가변 도메인의 일반적 설명에 대해서는 W008/020079의 59 페이지에 언급된 선행 기술 및 국제 특허 출원 W006/040153의 41 내지 43 페이지

에 언급된 참고문헌의 목록을 참조한다.  $V_H$  도메인은 단리된  $V_H$  도메인 (뿐만 아니라 자연 발생  $V_H$  도메인과 동일한 구조적 및 기능적 특성을 갖는 그를 기초로 한 나노바디) 및 이를 함유하는 폴리펩티드를 기능적 항원 결합 도메인 또는 폴리펩티드로서 고도로 유익하게 만드는 다수의 특유한 구조적 특성 및 기능적 특성을 갖는다. 특히,  $V_H$  도메인 (경쇄 가변 도메인의 부재 하에 또는 이와 임의의 상호작용을 보이지 않으면서, 본래 항원에 기능적으로 결합하도록 "설계된") 및 나노바디는 단일, 비교적 작은, 기능적 항원-결합 구조 단위, 도메인 또는 단백질로서 기능할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 나노바디는 자연 발생  $V_H$  도메인 및 그의 단편 뿐만 아니라 본원에서 상세히 논의되는 그의 변이체 및 유도체도 포함한다.

[0074] 본 발명의 가장 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 이중파라토프성 폴리펩티드는 상기 제1 항원 결합 도메인이 제1 나노바디 내에 포함되고, 상기 제2 항원 결합 도메인이 제2 나노바디 내에 포함되고, 상기 제1 및 제2 나노바디가 링커에 의해 연결된 것이다.

[0075]  $V_H$  도메인의 구조는 다음과 같이 나타낼 수 있고;

[0076] **FR-CDR-FR-CDR-FR-CDR-FR**

[0077] 본 발명의 이중파라토프성 폴리펩티드는 하기 구조 중 하나를 가질 수 있다:

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

[0078]

[0079] 여기서, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4가 제1 항원 결합 도메인을 포함하면 FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8이 제2 항원 도메인을 포함하고, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4가 제2 항원 도메인을 포함하면 FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8이 제1 항원 결합 도메인을 포함하고, HLE는 증가된 생체내 반감기를 제공하는 결합 단위이고, EXT는 하나 이상의 추가의 아미노산 잔기의 C-말단 연장부이다.

[0080] 따라서, 본원에 사용된 "본 발명에 따른 이중파라토프성 나노바디"는 링커에 의해 연결된 2개의 단일 나노바디를 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다.

[0081] 그러나, 본 발명의 이중파라토프성 나노바디는 각각의 나노바디에 오직 하나의 CDR만을 포함할 수 있다. 그러한 경우에 바람직한 CDR은 CDR3 및/또는 CDR6이다. 그러나, 본 발명에 따른 이중파라토프성 나노바디는 N-말단 나노바디에는 CDR1 또는 CDR2 또는 CDR3 또는 CDR1 및 CDR2 또는 CDR1 및 CDR3 또는 CDR2 및 CDR3 또는 CDR1 및 CDR2 및 CDR3을 포함하고 C-말단 나노바디에는 다음 조합 중의 어느 하나를 포함할 수 있다: CDR4 또는 CDR5 또는 CDR6 또는 CDR4 및 CDR5 또는 CDR4 및 CDR6 또는 CDR5 및 CDR6 또는 CDR4 및 CDR5 및 CDR6. 상기 나타낸 바와 같이, 본 발명의 이중파라토프성 나노바디는 모든 CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 및 CDR6을 포함할 수 있고, 각각의 CDR은 FR에 의해 플랭킹된다.

[0082] FR은 낙타류 공급원과 일치하는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 그러나, 바람직한 실시양태에서 하나 이상의 FR은 하나 이상의 서열 최적화 아미노산 치환을 갖고, 바람직하게는 하나 이상, 보다 바람직하게는 모든 FR이 부분적으로 또는 완전 인간화된다. 서열 최적화를 위한 치환은 아래에서 보다 상세히 논의한다.

[0083] 또한, 제1 및 제2 항원 결합 도메인이 나노바디가 아니라 상기 논의된 바와 같은 종래의 항체의 도메인 또는 단편, 예를 들어 인간 항체, 도메인 또는 단편에 있는 제1 및 제2 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인에 포함되는 본 발명의 실시양태에서, 그 내의 CDR(들)을 하나 이상의 낙타화 치환으로 변경하고 임의로 완전히 낙타화된 CDR을 생성하는 것이 가능한 것으로 본원에 언급된다.

[0084] 본원에 추가로 기재되는 바와 같이, 단일 나노바디 내의 아미노산 잔기의 전체 수는 110-120의 영역일 수 있고, 바람직하게는 112-115이고, 가장 바람직하게는 113이다. 그러나, 나노바디의 부분, 단편, 유사체 또는 유도체

(본원에 추가로 기재된 바와 같음)는 이러한 부분, 단편, 유사체 또는 유도체가 본원에 개략적으로 기재된 추가의 요건을 충족하고 본원에 기재된 목적에 바람직하게는 적합하다면 그의 길이 및/또는 크기로 특히 제한되지 않음을 유의하여야 한다.

[0085] 본원에 추가로 기재된 바와 같이, 나노바디의 아미노산 잔기는 문헌 [Riechmann and Muyldermans, J. Immunol. Methods 2000 Jun 23; 240 (1-2): 185-195] (예를 들어, 상기 간행물의 도 2 참조)에서 낙타류로부터의  $V_H$  도메인에 적용되는 바와 같이 문헌 [Kabat et al. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91)]에서 제시된  $V_H$  도메인에 대한 일반적 넘버링에 따라 넘버링되고, 따라서 나노바디의 FR1은 위치 1-30의 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, 나노바디의 CDR1은 위치 31-35의 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, 나노바디의 FR2는 위치 36-49의 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, 나노바디의 CDR2는 위치 50-65의 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, 나노바디의 FR3은 위치 66-94의 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, 나노바디의 CDR3은 위치 95-102의 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, 나노바디의 FR4는 위치 103-113의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 본 발명의 바람직한 이중과라토프성 나노바디에서, N-말단 나노바디는 상기 제시된 위치에 FR 및 CDR을 가질 수 있고, C-말단 나노바디에서 나노바디의 FR5는 위치 1-30의 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, 나노바디의 CDR4는 위치 31-35의 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, 나노바디의 FR6은 위치 36-49의 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, 나노바디의 CDR5는 위치 50-65의 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, 나노바디의 FR7은 위치 66-94의 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, 나노바디의 CDR6은 위치 95-102의 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, 나노바디의 FR8은 위치 103-113의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

[0086] 그러나, 항체, 특히 나노바디의 CDR 및 FR은 카바트에 대한 대안적 넘버링 시스템에 의해 확인할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 이들은 코티아, IMGT 및 AHO 시스템을 포함한다. 이들 대안적 넘버링 시스템에 따라 표 9, 13, 19, 32, 33 및 34에서 확인된 아미노산 서열 중 어느 하나의 CDR 또는 FR의 위치의 확인은 서열의 분석에 의해 달성할 수 있다. 이러한 목적을 위해, 다음 웹사이트를 참조할 수 있다: <http://www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/> (코티아); <http://imgt.cines.fr> (IMGT) 및 <http://www.bio.uzh.ch/antibody/index.html> (AHO). 구체적으로, 본원에 기재된 본 발명의 바람직한 이중과라토프성 나노바디에서, CDR 1, 2, 3, 4, 5 또는 6은 카바트에 대한 대안인 이들 넘버링 시스템 중 하나에 의해 규정될 수 있고, 본 발명의 범위 내에 또한 포함될 것이다.

[0087] 본 발명에 따른 일부 나노바디에 대한 코티아 CDR은 표 35에 제시된다.

[0088] 나노바디는 소위 " $V_H3$  부류" (즉,  $V_H3$  부류, 예컨대 DP-47, DP-51 또는 DP-29의 인간 배선 서열에 대해 높은 수준의 서열 상동성을 갖는 나노바디)일 수 있고, 이 나노바디는 본 발명의 이중과라토프성 나노바디의 구축에 바람직하다. 그러나, CXCR2에 대해 지시되는 임의의 유형의 나노바디, 및 예를 들어 WO 07/118670에 기재된 바와 같은 소위 " $V_H4$  부류" (즉,  $V_H4$  부류, 예컨대 DP-78의 인간 배선 서열에 대해 높은 수준의 서열 상동성을 갖는 나노바디)에 속하는 나노바디가 본 발명의 이중과라토프성 나노바디의 구축에 사용될 수 있음을 유의하여야 한다.

[0089] 본 발명에 따른 제1 및 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 하나 이상의 펩티드 또는 폴리펩티드를 연결하는 링커 분자는 이뮤노글로불린 기원일 수 있거나 아닐 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드가 이중과라토프성 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인, 예를 들어 나노바디인 경우에, 링커는 항원 결합 도메인을 포함하는 하나의 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인의 C-말단을 항원 결합 도메인을 포함하는 또 다른 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인의 N-말단에 연결시킨다.

[0090] 제1 및 제2 항원 결합 도메인을 함께, 특히 2개의 나노바디를 함께 연결하기 위해 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드에 사용하기 적합한 스페이서 또는 링커는 당업자에게 명백할 것이고, 일반적으로 아미노산 서열을 연결하기 위해 당업계에 사용되는 임의의 링커 또는 스페이서일 수 있다. 바람직하게는, 상기 링커 또는 스페이서는 제약 용도가 의도되는 단백질 또는 폴리펩티드를 구축하는데 사용하기에 적합하다.

[0091] 예를 들어, 링커는 적합한 아미노산 서열, 특히 1 내지 50, 바람직하게는 1 내지 30, 예컨대 1 내지 10개의 아미노산 잔기의 아미노산 서열일 수 있다. 이러한 아미노산 서열의 일부 바람직한 예는 예를 들어 WO 99/42077에 기재된 바와 같은 유형  $(gly_x ser_y)_z$ 의 gly-ser 링커, 예컨대 (예를 들어,  $(gly_4 ser)_3$  또는  $(gly_3 ser_2)_3$  및 본원에 언급된 아블린크스(Ablynx)의 출원 (예를 들어, WO 06/040153 및 WO 06/122825 참조)에 기재된 GS30, GS15, GS9 및 GS7 링커 뿐만 아니라 힌지-유사 영역, 예컨대 자연 발생 중쇄 항체의 힌지 영역 또는 유사한 서열 (예컨대, WO 94/04678에 기재됨)을 포함한다. 일부 다른 가능한 링커는 폴리-알라닌 (예컨대, AAA) 뿐만 아

나라 링커 GS30 (WO 06/122825의 서열 85) 및 GS9 (WO 06/122825의 서열 84)이다.

- [0092] 본 발명에 따른 바람직한 링커는 3 내지 50개, 예를 들어 3 내지 9, 10 내지 15, 16 내지 20, 21 내지 25, 26 내지 35, 36 내지 40, 41 내지 45 또는 46 내지 50개 아미노산 길이의 펩티드 링커이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 펩티드 링커는 35개 아미노산 길이이다. 링커는 단지 2개의 상이한 아미노산으로 이루어질 수 있다. 상이한 바와 같이 이들은 글리신 및 세린일 수 있다. 대안적으로, 이들은 프롤린 및 세린일 수 있다.
- [0093] 본 발명의 일부 실시양태, 특히 본 발명의 이중과라토프성 나노바디에서, 펩티드 링커는 다음 아미노산 서열로 이루어진다:
- [0094] **GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (서열 220).**
- [0095] 다른 적합한 링커는 일반적으로 유기 화합물 또는 중합체, 특히 제약 용도를 위한 단백질에 사용하기 적합한 것을 포함한다. 예를 들어, 폴리(에틸렌글리콜) 모이어티가 항체 도메인을 연결하기 위해 사용되었다 (예를 들어, WO 04/081026 참조).
- [0096] 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 2개 이상의 폴리펩티드를 포함하는 분자에 관한 것이고, 상기 분자는 케모카인 수용체 CXCR2에 대해 지시되거나 또는 이에 결합하고, 여기서 제1 폴리펩티드는 제1 이뮤노글로불린 항원 결합 도메인을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 제2 이뮤노글로불린 항원 결합 도메인을 포함하고, 상기 제1 및 제2 항원 결합 도메인은 CXCR2 상의 제1 및 제2 에피토프를 인식하고, 상기 2개 이상의 폴리펩티드는 비-펩티드 링커에 의해 연결된다.
- [0097] 바람직하게는, 본 발명의 측면에서, 제1 항원 결합 도메인은 서열 7에 제시된 아미노산의 서열로 이루어진 선형 펩티드에 결합할 수 있고, 상기 제2 항원 결합 도메인은 상기 선형 펩티드에 결합할 수 없거나 또는 보다 낮은 친화도로 결합한다. 바람직하게는, 제1 에피토프는 CXCR2의 아미노산 1 내지 19를 포함하거나 그 내에 존재하고, 제2 에피토프는 CXCR2의 아미노산 1 내지 19 외부에 존재한다.
- [0098] 바람직하게는, 본 발명의 이러한 측면에서, 제1 및 제2 항원 결합 도메인은 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 내에 포함되고, 여기서 상기 제1 및 제2 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인은 바람직하게는 나노바디 및 특히 구체적으로 본원에 기재된 임의의 나노바디이다.
- [0099] 본원에 기재된 본 발명의 모든 측면에서, 링커의 본질적인 특성은 제1 및 제2 항원 결합 도메인이 CXCR2 상의 그 각각의 에피토프에 결합하도록 허용하는 길이 및 입체형태를 갖는다는 것이다.
- [0100] 사용되는 링커(들)는 또한 본 발명의 폴리펩티드에 하나 이상의 다른 유리한 특성 또는 기능을 부여하고/하거나 유도체의 형성을 위한 및/또는 기능적 기의 부착을 위한 하나 이상의 부위 (예를 들어, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디의 유도체에 대해 본원에 기재됨)를 제공할 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 하전된 아미노산 잔기를 함유하는 링커 (국제 특허 출원 WO 08/020079의 48 페이지의 표 A-2 참조)는 개선된 친수성 특성을 제공할 수 있는 반면에, 작은 에피토프 또는 태그를 형성하거나 함유하는 링커는 검출, 확인 및/또는 정제를 위해 사용될 수 있다. 다시, 본원의 개시내용을 기초로 하여, 당업자는 임의로 일부 제한된 통상적인 실험 후에 본 발명의 특정 폴리펩티드에 사용하기 위한 최적 링커를 결정할 수 있을 것이다.
- [0101] 2개 이상의 링커가 본 발명의 폴리펩티드에 사용되는 경우에, 이들 링커는 동일하거나 상이할 수 있다. 다시, 본원의 개시내용을 기초로 하여, 당업자는 임의로 일부 제한된 통상적인 실험 후에 본 발명의 특정 폴리펩티드에 사용하기 위한 최적 링커를 결정할 수 있을 것이다.
- [0102] 현재 놀랍게도 일부 개체의 혈청이 이들 개체가 이전에 나노바디에 노출된 적이 없다 하더라도 본 발명의 CXCR2 나노바디와 상호작용할 수 있는 IgG 분자를 함유하는 것으로 밝혀졌다. 이는 CH1 도메인에 의해 항체에서 정상적으로 숨겨지는 영역인 인간화 Vh 도메인 내의 입체형태적 에피토프와 IgG 분자의 상호작용으로 인한 것으로 밝혀졌다. 이러한 문제를 극복하기 위해, 본 발명은 C-말단 연장부를 포함하는 CXCR2에 대해 특이적인 이중과라토프성 나노바디를 제공한다. 이러한 C-말단 연장부는 IgG 분자 및 나노바디 사이의 결합 상호작용을 효율적으로 억제하는 것으로 밝혀졌다. 본 발명자들은 이러한 상호작용을 차단하기 위해 다양한 C-말단 연장부 (A, AA, AS, AST, ASTKP, GGG)를 나노바디 서열에 추가할 수 있다는 것을 발견하였다. 바람직한 C-말단 연장부는 2개의 알라닌 잔기 (AA)이다.
- [0103] 통상적으로, 발현 및 생산의 용이성을 위해, 본 발명의 폴리펩티드는 선형 폴리펩티드일 것이다. 그러나, 본 발명은 가장 넓은 의미에서 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드가 3개 이상의 나노바디를

포함할 경우에, 이들을 3개 이상의 "아암"을 갖는 링커를 사용하여 연결하는 것이 가능하고, 각각의 "아암"은 "별-형태의" 구축물을 제공하도록 나노바디에 연결된다. 또한, 통상적으로 덜 바람직하기는 하지만 원형 구축물을 사용할 수도 있다.

[0104] 특히, 상기 확인된 하나 이상의 링커를 갖는 2개 이상의 나노바디의 임의의 정렬을 제조할 수 있다. 예를 들어, CXCR2에 대해 지시되거나 또는 이에 결합하는 2개의 이뮤노글로불린 결합 도메인 및 인간 혈청 알부민(HSA)에 대해 지시되거나 또는 이에 결합하는 하나 이상의 이뮤노글로불린 결합 도메인을 포함하는 이중파라토프성, 이중특이적 나노바디가 고려될 수 있고, 상기 HSA 결합 도메인은 임의의 위치에서, 예를 들어 2개의 CXCR2 결합 나노바디 사이에서 본원에 정의된 링커를 통해 CXCR2 결합 나노바디에 연결된 나노바디 내에 포함될 수 있다.

[0105] 본 발명자들은 본 발명에 따른 이중파라토프성 폴리펩티드를 제조하였다. 다가 및 이중파라토프성 항-CXCR2 나노바디의 아미노산 서열은 본원의 실시예 내의 표 13에 제시된다. 이들 중에서, 본 발명에 따른 특히 바람직한 폴리펩티드는 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 및 163E3-2B2 뿐만 아니라 127D1-97A9, 54B12-97A9 및 97A9-127D1로서 표 13에 지정된 이중파라토프성 나노바디 및 그의 서열-최적화된 변이체이다. 모든 이들 이중파라토프성 나노바디는 서열 7에 제시된 아미노산의 서열 (CXCR2의 아미노산 1-19)로 이루어지는 선형 펩티드에 결합할 수 있는 제1 항원 결합 도메인을 포함하는 제1 나노바디 및 상기 선형 펩티드에 결합할 수 없거나 또는 보다 낮은 친화도로 결합하는 제2 항원 결합 도메인을 포함하는 제2 나노바디를 포함한다 (표 8 참조). 본 발명에 따라 특히 바람직한 것은 163D2-127D1, 163E3-127D1, 163E3-54B12, 163D2-54B12, 2B2-163E3, 2B2-163D2, 97A9-2B2 및 97A9-54B12이다.

[0106] 본원에 이미 논의된 바와 같이, 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 또는 163E3/2B2로 지정된 특정 실시양태 및 그의 변이체를 포함하는 본 발명의 바람직한 이중파라토프성 나노바디가 그의 프레임워크 영역 내에 하나 이상의 서열 최적화 아미노산 치환을 갖고, 상기 프레임워크 영역이 예를 들어 부분적으로 또는 완전히 인간화될 수 있다면 바람직할 것이다. 서열 최적화의 정도는 서열 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47, 61, 53, 54, 46, 69, 68, 67 또는 66과 프레임워크 영역에 대해 적어도 80 내지 90% 서열 동일성을 갖는 이중파라토프성 나노바디를 생성한다면 바람직할 것이다.

[0107] 본 발명의 실시양태는 제1 항원 결합 도메인이 서열 213, 214, 216 및 219 또는 이들 중 하나에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택되고, 제2 항원 결합 도메인이 서열 215, 217 및 218, 또는 이들 중 하나에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택되는 것인 폴리펩티드를 추가로 포함한다.

[0108] (0079-0076)

[0109] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 CDR1이 서열 141에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR2가 서열 236에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR3이 서열 181에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상기 단일 가변 도메인의 제2 이뮤노글로불린을 포함하고, CDR4가 서열 146에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR5가 서열 237에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR6이 서열 186에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상기 단일 가변 도메인의 제1 이뮤노글로불린을 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서, CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 또는 CDR6의 아미노산 서열은 서열 141, 236, 181, 146, 237 또는 186에 제시된 아미노산 서열 중 어느 하나에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 아미노산 동일성을 갖는다.

[0110] 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 141, 236, 181, 146, 237 또는 186에 제시된 것과 단지 보존적 아미노산 변화에서만 상이한 아미노산 서열을 포함한다.

[0111] 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 216 또는 서열 216에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택되는 제1 항원 결합 도메인, 및 서열 217, 또는 서열 217에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택되는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0112] 또 다른 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 221을 포함한다.

[0113] (0079-0086)

- [0114] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 CDR1이 서열 141에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR2가 서열 236에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR3이 서열 181에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상기 단일 가변 도메인의 제2 이뮤노글로불린을 포함하고, CDR4가 서열 145에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR5가 서열 165에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR6이 서열 185에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상기 단일 가변 도메인의 제1 이뮤노글로불린을 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서, CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 또는 CDR6의 아미노산 서열은 서열 141, 236, 181, 145, 165 또는 185에 제시된 아미노산 서열 중 어느 하나에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 아미노산 동일성을 갖는다.
- [0115] 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 141, 236, 181, 145, 165 또는 185에 제시된 것과 단지 보존적 아미노산 변화에서만 상이한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0116] 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 216 또는 서열 216에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택되는 제1 항원 결합 도메인, 및 서열 218, 또는 서열 218에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택되는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0117] 또 다른 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 222를 포함한다.
- [0118] (0079-0061)
- [0119] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 CDR1이 서열 141에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR2가 서열 236에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR3이 서열 181에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상기 단일 가변 도메인의 제2 이뮤노글로불린을 포함하고, CDR4가 서열 143에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR5가 서열 235에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR6이 서열 183에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상기 단일 가변 도메인의 제1 이뮤노글로불린을 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서, CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 또는 CDR6의 아미노산 서열은 서열 141, 236, 181, 143, 235 또는 183에 제시된 아미노산 서열 중 어느 하나에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 아미노산 동일성을 갖는다.
- [0120] 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 141, 236, 181, 143, 235 또는 183에 제시된 것과 단지 보존적 아미노산 변화에서만 상이한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0121] 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 216 또는 서열 216에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택되는 제1 항원 결합 도메인, 및 서열 220의 링커에 의해 분리된, 서열 215, 또는 서열 215에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택되는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0122] (0104-0076)
- [0123] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 CDR1이 서열 151에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR2가 서열 171에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR3이 서열 191에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상기 단일 가변 도메인의 제2 이뮤노글로불린을 포함하고, CDR4가 서열 146에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR5가 서열 237에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR6이 서열 186에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상기 단일 가변 도메인의 제1 이뮤노글로불린을 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서, CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 또는 CDR6의 아미노산 서열은 서열 151, 171, 191, 146, 237 또는 186에 제시된 아미노산 서열 중 어느 하나에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 아미노산 동일성을 갖는다.
- [0124] 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 151, 171, 191, 146, 237 또는 186에 제시된 것과 단지 보존적 아미노산 변화에서만 상이한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0125] 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 219 또는 서열 219에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택되는 제1 항원 결합 도메인, 및 서열 217, 또는 서열 217에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택되는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0126] 또 다른 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 223을 포함한다.
- [0127] (0104-0086)
- [0128] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 CDR1이 서열 151에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR2가 서열

171에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR3이 서열 191에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상기 단일 가변 도메인의 제2 이뮤노글로불린을 포함하고, CDR4가 서열 145에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR5가 서열 165에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR6이 서열 185에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상기 단일 가변 도메인의 제1 이뮤노글로불린을 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서, CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 또는 CDR6의 아미노산 서열은 서열 151, 171, 191, 145, 165 또는 185에 제시된 아미노산 서열 중 어느 하나에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 아미노산 동일성을 갖는다.

[0129] 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 151, 171, 191, 145, 165 또는 185에 제시된 것과 단지 보존적 아미노산 변화에서만 상이한 아미노산 서열을 포함한다.

[0130] 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 219 또는 서열 219에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택되는 제1 항원 결합 도메인, 및 서열 218, 또는 서열 218에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택되는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0131] 또 다른 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 224를 포함한다.

[0132] (0104-0061)

[0133] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 CDR1이 서열 151에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR2가 서열 171에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR3이 서열 191에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상기 단일 가변 도메인의 제2 이뮤노글로불린을 포함하고, CDR4가 서열 143에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR5가 서열 235에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, CDR6이 서열 183에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상기 단일 가변 도메인의 제1 이뮤노글로불린을 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서, CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 또는 CDR6의 아미노산 서열은 서열 151, 171, 191, 143, 235 또는 183에 제시된 아미노산 서열 중 어느 하나에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 아미노산 동일성을 갖는다.

[0134] 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 151, 171, 191, 143, 235 또는 183에 제시된 것과 단지 보존적 아미노산 변화에서만 상이한 아미노산 서열을 포함한다.

[0135] 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 219 또는 서열 219에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택되는 제1 항원 결합 도메인, 및 서열 220의 링커에 의해 분리된, 서열 215 또는 서열 215에 대해 80% 이상, 예컨대 90% 이상, 예를 들어 95% 이상의 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택되는 제2 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0136] 또 다른 측면에서, 본 발명은 CXCR2 결합에 대해 1가이고 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드에 대한 빌딩 블록이고 그의 생산 방법의 중간체로서 간주될 수 있는 폴리펩티드, 특히 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인, 예컨대  $V_{H1}$  도메인 또는 나노바디를 제공한다. 바람직한 1가 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인은 표 9에 제시된 서열 25 내지 43 및 90을 갖는 폴리펩티드 또는 서열 25 내지 43 및 90 중의 어느 하나에 대해 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드이다.

[0137] 바람직한 1가 폴리펩티드는 서열 36에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 36에 대해 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 137B7로 지정된 것이다. 바람직한 실시양태에서, 서열 36의 프레임워크 영역은 하나 이상의 서열 최적화 아미노산 치환을 갖는다. 다른 바람직한 1가 폴리펩티드는 프레임워크 영역 내에서 서열 최적화된 것을 비롯하여 127D1, 2B2, 54B12, 97A9, 163D2 및 163E3으로 지정된 것이다.

[0138] 예를 들어, 127D1은 표 26에서 고려되는 하나 이상의 서열-최적화 치환이 이루어진 서열 37의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 바람직하게는 폴리펩티드는 서열 216에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0139] 2B2는 표 20에서 고려되는 하나 이상의 서열-최적화 치환이 이루어진 서열 43의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 바람직하게는 폴리펩티드는 서열 213 또는 214에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0140] 54B12는 표 30에서 고려되는 하나 이상의 서열-최적화 치환이 이루어진 서열 90의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 바람직하게는 폴리펩티드는 서열 219에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0141] 97A9는 표 22에서 고려되는 하나 이상의 서열-최적화 치환이 이루어진 서열 39를 포함할 수 있고, 바람직하게는 폴리펩티드는 서열 215에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

- [0142] 163D2는 표 28에서 고려되는 하나 이상의 서열-최적화 치환이 이루어진 서열 41의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 바람직하게는 폴리펩티드는 서열 218에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0143] 163E3은 표 24에서 고려되는 하나 이상의 서열-최적화 치환이 이루어진 서열 42에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 바람직하게는 폴리펩티드는 서열 217에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0144] 또한, 서열 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47 또는 61 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드와 CXCR2에 대한 결합을 교차-차단할 수 있는 1가 폴리펩티드, 특히 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인, 예컨대 나노바디가 본 발명의 상기 측면에 포괄된다.
- [0145] 상기 논의된 임의의 바람직한 1가 나노바디, 특히 137B7은 본원에 언급된 용도를 위해, 예를 들어 COPD의 치료에 사용될 수 있다.
- [0146] 그의 모든 낙타화 및 인간화 버전을 비롯하여 본 발명에 따른 이중과라토프성 폴리펩티드, 특히 상기 논의된 바람직한 이중과라토프성 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인은 CXCR2의 조절제이고, 특히 CXCR2 신호 전달을 억제한다.
- [0147] 바람직하게는, 이중과라토프성 폴리펩티드, 특히 본 발명의 이중과라토프성 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 내의 CDR 서열 및 FR 서열은 이들이
- [0148]  $-10^{-5}$  내지  $10^{-12}$  몰/리터 이하, 바람직하게는  $10^{-7}$  내지  $10^{-12}$  몰/리터 이하, 보다 바람직하게는  $10^{-8}$  내지  $10^{-12}$  몰/리터의 해리 상수 ( $K_D$ )로 (즉,  $10^5$  내지  $10^{12}$  리터/몰 이상, 바람직하게는  $10^7$  내지  $10^{12}$  리터/몰 이상, 보다 바람직하게는  $10^8$  내지  $10^{12}$  리터/몰의 회합 상수 ( $K_A$ )로) CXCR2에 결합하도록 하고/거나;
- [0149] 이들이
- [0150]  $-10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  내지 약  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , 바람직하게는  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  내지  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , 보다 바람직하게는  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  내지  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , 예컨대  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  내지  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 의  $k_{on}$ -비율로 CXCR2에 결합하도록 하고/거나;
- [0151] 이들이
- [0152]  $-1 \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2}=0.69 \text{ s}$ ) 내지  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$  (수일의  $t_{1/2}$ 를 갖는 큰 비가역적 복합체를 제공함), 바람직하게는  $10^{-2} \text{ s}^{-1}$  내지  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , 보다 바람직하게는  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  내지  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , 예컨대  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  내지  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 의  $k_{off}$  비율로 CXCR2에 결합하도록 한다.
- [0153] 바람직하게는, 본 발명의 폴리펩티드 및 이중과라토프성 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인에 존재하는 CDR 서열 및 FR 서열은 이들이 500 nM 미만, 바람직하게는 200 nM 미만, 보다 바람직하게는 10 nM 미만, 예컨대 500 pM 미만의 친화도로 CXCR2에 결합하도록 하는 것이다.
- [0154] 특히, 본원의 실시예에 제시되는 바와 같이, 본 발명의 바람직한 이중과라토프성 나노바디는 20 nM 미만의 IC50으로 인간 CXCR2에 대한 Gro- $\alpha$ 의 결합을 억제할 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 이중과라토프성 나노바디는 또한 100 nM 미만의 IC50으로 CXCR2 보유 RBL 세포로부터 효능제 유도된 (Gro- $\alpha$ ) Ca 방출을 억제할 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 이중과라토프성 나노바디는 또한 50 nM 미만의 IC50으로 CXCR2-CHO 막 내의 효능제 유도된 (Gro- $\alpha$ ) [ $^{35}\text{S}$ ]GTP  $\gamma$ S 축적을 억제할 수 있다. 본 발명의 바람직한 이중과라토프성 나노바디는 또한 Gro- $\alpha$ 에 대한 노출시에 인간 백혈구 형상 변화를 < 1nm (1nm 미만)의 IC50으로 또는 시노물구스 백혈구 형상 변화를 < 2nm (2nm 미만)의 IC50으로 억제할 수 있다.
- [0155] 본 발명의 가장 바람직한 측면에 따르면, 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드, 예컨대 이중과라토프성 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인, 예를 들어 본원에 기재된 나노바디는 임의의 또는 모든 서열 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47 또는 61에 제시된 폴리펩티드와 서열 1의 아미노산 서열을 갖는 CXCR2 폴리펩티드에 대한 결합을 교차-차단할 것이다. 교차-차단은 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0156] 제약 용도를 위해, 본 발명의 폴리펩티드는 바람직하게는 인간 CXCR2, 예를 들어 서열 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 대해 지시되는 반면에; 수의학적 목적을 위해, 본 발명의 폴리펩티드는 바람직하게

는 치료되는 종으로부터의 CXCR2에 대해 지시되거나, 또는 적어도 치료되는 종으로부터의 CXCR2와 교차-반응성이다.

- [0157] 추가로, 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드는 임의로, 및 CXCR2에 대한 결합을 위한 2개 이상의 항원 결합 도메인 이외에, 다른 에피토프, 항원, 단백질 또는 표적에 대한 결합을 위한 하나 이상의 추가의 결합 부위 또는 도메인을 포함할 수 있다.
- [0158] 본 발명의 폴리펩티드, 및 이를 포함하는 조성물의 효능은 폴리펩티드가 COPD 또는 이상 CXCR2 신호 전달을 수반하는 임의의 다른 질환의 치료에 유용할 수 있음을 나타내기 위해 적합한, 그 자체로 공지된 임의의 적합한 시험관내 검정, 세포-기반 검정, 생체내 검정 및/또는 동물 모델, 또는 이들의 임의의 조합을 사용하여 시험할 수 있다. 적합한 검정 및 동물 모델은 당업자에게 명백할 것이다.
- [0159] 또한, 본 발명에 따르면, 인간 CXCR2에 대해 지시되는 폴리펩티드는 온혈 동물의 하나 이상의 다른 종으로부터의 CXCR2와 교차-반응성을 보이거나 보이지 않을 수 있다. 그러나, 바람직하게는 인간 CXCR2에 대해 지시되는 본 발명의 폴리펩티드는 독성 시험을 위해 하나 이상의 다른 종의 영장류 (예컨대, 비제한적으로, 마카카 (*Macaca*) 속으로부터의 원숭이 (예컨대, 및 특히, 시노물구스 원숭이 (마카카 과시쿨라리스(*Macaca fascicularis*)) 및/또는 레서스 원숭이 (마카카 몰라타(*Macaca mulatta*))) 및 개코원숭이 (파피오 우르시누스(*Papio ursinus*)))로부터의 CXCR2와 교차-반응성을 보일 것이다. 바람직한 교차-반응성은 시노물구스 원숭이로부터의 CXCR2와의 교차-반응성이다. 질환에 대한 동물 모델 (예를 들어, 마우스, 래트, 마우스, 돼지 또는 개), 및 특히 CXCR2와 연관된 질환 및 장애에 대한 동물 모델에서 종종 사용되는 하나 이상의 종의 동물과의 교차-반응성이 바람직할 수 있다. 이와 관련하여, 존재할 경우 상기 교차-반응성은, 인간 CXCR2에 대해 지시되는 아미노산 서열 및 폴리펩티드가 상기 질환 모델에서 시험되도록 허용할 수 있기 때문에 약물 개발 관점에서 이점을 가질 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다.
- [0160] 보다 일반적으로, 다수의 종의 포유동물로부터의 CXCR2와 교차-반응성인 본 발명의 폴리펩티드는, 동일한 폴리펩티드가 다수의 종에 걸쳐 사용되도록 허용할 것이기 때문에 수의학적 용도로 사용하기에 통상적으로 유익할 것이다.
- [0161] 바람직하게는, 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드는 CXCR1 또는 CXCR4와 교차-반응성이 아니다.
- [0162] 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드에서, 하나 이상의 항원 결합 부위는 상호작용 부위, 즉 CXCR2가 또 다른 분자, 예를 들어 그의 천연 리간드 또는 리간드와 상호작용할 부위에 대해 지시될 수 있다.
- [0163] 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드, 예를 들어 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인은 제2 항원 결합 도메인이 서열 7의 선형 펩티드에 결합하지 않고, 서열 8, 9, 10, 11 또는 12에서 본원에 제시된 펩티드를 포함하거나 그 내부에 존재하는 에피토프를 인식하도록 하는 것일 수 있다. 또한, 제1 항원 결합 도메인은 서열 7의 펩티드를 포함하거나 그 내부에 존재하는 에피토프를 인식할 수 있다.
- [0164] 시노물구스 원숭이 CXCR2와 교차-반응하는 본 발명의 실시양태에서, 제1 항원 결합 도메인은 또한 서열 4의 펩티드를 포함하거나 그 내부에 존재하는 에피토프를 인식한다. 상기 실시양태에서 제2 항원 결합 도메인은 서열 5 또는 6의 펩티드를 포함하거나 그 내부에 존재하는 에피토프를 인식할 수 있다.
- [0165] 또한, 일반적으로 CXCR2의 모든 자연 발생 또는 합성 유사체, 변이체, 돌연변이체, 대립유전자, 일부 및 단편; 또는 적어도 본 발명의 폴리펩티드가 결합하는 CXCR2 내의 (예를 들어, 서열 1의 야생형 CXCR2 내의) 항원 결정기(들) 또는 에피토프(들)와 본질적으로 동일한 하나 이상의 항원 결정기 또는 에피토프를 함유하는 CXCR2의 유사체, 변이체, 돌연변이체, 대립유전자, 일부 및 단편에 결합하는 이중과라토프성 폴리펩티드, 특히 이중과라토프성 나노바디의 유형이 본 발명의 범위 내에서 제공된다. 이러한 경우에, 본 발명의 폴리펩티드는 본 발명의 폴리펩티드가 (야생형) CXCR2에 결합하는 상기 논의된 친화도 및 특이성과 동일하거나 상이한 (즉, 보다 높거나 보다 낮은) 친화도 및/또는 특이성으로 이러한 유사체, 변이체, 돌연변이체, 대립유전자, 일부 및 단편에 결합할 수 있다.
- [0166] 또한, 당업자에게 명백한 바와 같이, 이중과라토프성인 폴리펩티드는 CXCR2에 대해 상응하는 단일 항원 결합 도메인 폴리펩티드보다 높은 결합력으로 결합한다.
- [0167] 또한, 항상 전체 폴리펩티드와 동등한 관련 기능적 도메인을 포함한다면, 이중과라토프성 폴리펩티드, 특히 본 발명의 이중과라토프성 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인의 부분, 단편, 유사체, 돌연변이체, 변이체, 대립유전자 및/또는 유도체를 본원에 논의된 다양한 치료 측면에 사용하는 것이 본 발명의 범위 내에 포함된다. 이러한

부분, 단편, 유사체, 돌연변이체, 변이체, 대립유전자 또는 유도체는 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드에 대해 상기 논의된 모든 기능적 특성을 가질 수 있다.

- [0168] 또 다른 측면에서, 본 발명은 임의로 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위를 추가로 포함하는 이중과라토프성 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인에 관한 것이다. 이러한 추가의 기, 잔기, 모이어티, 결합 단위 또는 아미노산 서열은 추가의 기능성을 본 발명의 폴리펩티드에 제공하거나 제공하지 않을 수 있고, 그의 특성을 변경하거나 변경하지 않을 수 있다.
- [0169] 예를 들어, 이러한 추가의 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위는 본 발명의 (융합) 단백질 또는 (융합) 폴리펩티드가 되도록 하는 하나 이상의 추가의 아미노산 서열일 수 있다. 바람직하지만 비제한적인 측면에서, 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위는 이뮤노글로불린 서열이다. 훨씬 더 바람직하게는, 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위는 도메인 항체, 도메인 항체로서 사용하기 적합한 아미노산 서열, 단일 도메인 항체, 단일 도메인 항체로서 사용하기 적합한 아미노산 서열, "dAb", dAb로서 사용하기 적합한 아미노산 서열, 또는 나노바디로 이루어진 군 중에서 선택된다.
- [0170] 대안적으로, 상기 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위는 예를 들어 그 단독으로 생물학적으로 및/또는 약리학적으로 활성을 보이거나 또는 보이지 않을 수 있는 화학적 기, 잔기, 모이어티일 수 있다. 예를 들어, 상기 기는 본원에 추가로 기재된 바와 같이 본 발명의 폴리펩티드의 "유도체"를 제공하기 위해 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드에 연결될 수 있다.
- [0171] 이러한 구축물에서, 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드 및 하나 이상의 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위는 서로 직접 및/또는 하나 이상의 적합한 링커 또는 스페이서를 통해 연결될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위가 아미노산 서열인 경우에, 링커는 생성되는 구축물이 융합 (단백질) 또는 융합 (폴리펩티드)가 되도록 하는 아미노산 서열일 수도 있다.
- [0172] 상기 및 본원의 추가의 기재로부터 명백한 바와 같이, 이는 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드가, 다중 과라토프성 및 임의로 다가 또는 다중특이적, 2가/다가 및 이중/다중특이적인 본원에 논의되는 구축물을 형성하기 위해 이를 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위와 적합하게 조합함으로써 본 발명의 추가의 폴리펩티드를 형성하기 위한 "빌딩 블록"으로서 사용될 수 있음을 의미한다.
- [0173] 본 발명의 이러한 측면의 폴리펩티드는 일반적으로 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드를 하나 이상의 추가의 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위, 임의로 하나 이상의 적합한 링커를 통해 적합하게 연결하는 하나 이상의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0174] 본 발명의 한 구체적 측면에서, 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드는 본 발명의 상응하는 비변형된 폴리펩티드에 비해 증가된 반감기를 갖도록 변형된다. 일부 바람직한 폴리펩티드는 본원의 추가의 개시내용을 기초로 하여 당업자에게 명백해질 것이고, 예를 들어 그의 반감기를 증가시키기 위해 화학적으로 변형된 (예를 들어, PEG화, PAS화 또는 HES화에 의해) 본 발명의 아미노산 서열 또는 폴리펩티드를 포함하고; 본 발명의 폴리펩티드는 혈청 단백질 (예컨대, 혈청 알부민)에 대한 결합을 위한 하나 이상의 추가의 결합 부위를 포함할 수 있거나; 또는 본 발명의 폴리펩티드는 본 발명의 폴리펩티드의 반감기를 증가시키는 하나 이상의 모이어티 (및 특히 하나 이상의 아미노산 서열)에 연결된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 반감기를 연장하는 모이어티 또는 아미노산 서열을 포함하는 본 발명의 폴리펩티드의 예는 하나 이상의 혈청 단백질 또는 그의 단편 (예컨대, (인간) 혈청 알부민 또는 적합한 그의 단편)에 또는 혈청 알부민에 결합할 수 있는 하나 이상의 결합 단위 (예컨대, 예를 들어 도메인 항체, 도메인 항체로서 사용하기 적합한 아미노산 서열, 단일 도메인 항체, 단일 도메인 항체로서 사용하기 적합한 아미노산 서열, "dAb", dAb로서 사용하기 적합한 아미노산 서열, 또는 혈청 단백질, 예컨대 혈청 알부민 (예컨대, 인간 혈청 알부민), 혈청 이뮤노글로불린, 예컨대 IgG, 또는 트랜스페린에 결합할 수 있는 나노바디에 적합하게 연결하는 폴리펩티드; Fc 부분 (예컨대, 인간 Fc) 또는 적합한 일부 또는 그의 단편에 연결된 폴리펩티드를 포함한다. 또한, 혈청 단백질에 결합할 수 있는 하나 이상의 소형 단백질 또는 펩티드 (예컨대, 비제한적으로, WO 91/01743, WO 01/45746, WO 02/076489, 및 2006년 12월 5일에 출원된 아블린크스 N.V.의 미국 가출원 (표제: "Peptides capable of binding to serum proteins")에 기재된 단백질 및 펩티드 (또한 PCT/EP2007/063348 참조))에 연결된 본 발명의 폴리펩티드도 본 발명 내에 포함된다.
- [0175] 제약 단백질의 반감기 증가 및/또는 면역원성 증가를 위한 가장 널리 사용되는 기술 중 하나는 적합한 약리학상 허용되는 중합체, 예컨대 폴리(에틸렌글리콜) (PEG) 또는 그의 유도체 (예컨대, 메톡시폴리(에틸렌글리콜) 또는 mPEG)의 부착을 포함한다. 일반적으로, 임의의 적합한 형태의 PEG화, 예컨대 항체 및 항체 단편 ((단일) 도메

인 항체 및 ScFv를 포함하나 이에 제한되지는 않음)에 대해 당업계에 사용되는 PEG화를 사용할 수 있고; 예를 들어 문헌 [Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); Veronese and Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003), Harris and Chess, Nat. Rev. Drug. Discov., 2, (2003)] 및 WO 04/060965를 참조한다. 또한, 단백질의 PEG화를 위한 다양한 시약은 상업적으로, 예를 들어 넥타 테라퓨틱스(Nektar Therapeutics, 미국)로부터 상업적으로 입수가능하다.

- [0176] 바람직하게는, 특히 시스테인-잔기를 통한 부위-지정된 PEG화가 사용된다 (예를 들어, 문헌 [Yang et al., Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003)] 참조). 예를 들어, 이를 위해, PEG는 본 발명의 이중과라토프성 나노바디에서 자연 발생하는 시스테인 잔기에 부착될 수 있다. 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드는 모두 당업자에게 공지된 단백질 조작 기술을 이용하여 PEG의 부착을 위한 하나 이상의 시스테인 잔기를 적합하게 도입하기 위해 변형될 수 있거나, 또는 PEG의 부착을 위한 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 아미노산 서열이 이중과라토프성 폴리펩티드의 N- 및/또는 C-말단에 융합될 수 있다.
- [0177] 바람직하게는, 본 발명의 이중과라토프성 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 및 폴리펩티드에 대해, 사용되는 PEG의 분자량은 5000 초과, 예컨대 10,000 초과 200,000 미만, 예컨대 100,000 미만; 예를 들어 20,000-80,000의 범위이다.
- [0178] PEG화는 이뮤노글로불린 가변 도메인 중 하나 또는 둘 다에 및/또는 임의의 펩티드 링커 영역에 적용될 수 있다. 적합한 PEG화 기술은 EP 1639011에 기재되어 있다.
- [0179] PEG에 대한 대안으로서, 반감기는 히드록시에틸 전분 (HES) 유도체의 본 발명의 폴리펩티드에 대한 부착을 수반하는 HES화로 공지된 기술에 의해 연장될 수 있다. 사용되는 히드록시에틸 전분은 분자량을 조정하기 위해 산 가수분해에 의해 변형되고 그 내의 글루코스 잔기가 히드록시에틸화된 찰옥수수 전분으로부터 유래된 아밀로펙틴이다. 추가의 상세한 내용은 문헌 [Paviscic R, et al., Int J Pharm (2010) March 15, 387 (1-2):110-9]으로부터 얻을 수 있다.
- [0180] 일반적으로, 증가된 반감기를 갖는 본 발명의 폴리펩티드는 바람직하게는 본 발명의 상응하는 폴리펩티드 자체의 반감기보다 1.5배 이상, 바람직하게는 2배 이상, 예컨대 5배 이상, 예를 들어 10배 이상 또는 20배 초과로 더 큰 반감기를 갖는다. 예를 들어, 증가된 반감기를 갖는 본 발명의 폴리펩티드는 본 발명의 상응하는 폴리펩티드 자체에 비해 1시간 초과, 바람직하게는 2시간 초과, 보다 바람직하게는 6시간 초과, 예컨대 12시간 초과, 또는 심지어 24, 48 또는 72시간 초과로 증가된 반감기를 가질 수 있다.
- [0181] 본 발명의 바람직한 측면에서, 본 발명의 상기 폴리펩티드는 본 발명의 상응하는 폴리펩티드 자체에 비해 1시간 초과, 바람직하게는 2시간 초과, 보다 바람직하게는 6시간 초과, 예컨대 12시간 초과, 또는 심지어 24, 48 또는 72시간 초과로 증가된 혈청 반감기를 갖는다,
- [0182] 본 발명의 또 다른 바람직한 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드는 인간에서 약 12시간 이상, 바람직하게는 24시간 이상, 보다 바람직하게는 48시간 이상, 훨씬 더 바람직하게는 72시간 이상 또는 그 초과로 혈청 반감기를 보인다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드는 5일 이상 (예컨대, 약 5 내지 10일), 바람직하게는 9일 이상 (예컨대, 약 9 내지 14일), 보다 바람직하게는 약 10일 이상 (예컨대, 약 10 내지 15일), 또는 약 11일 이상 (예컨대, 약 11 내지 16일), 보다 바람직하게는 약 12일 이상 (예컨대, 약 12 내지 18일 또는 그 초과), 또는 14일 초과 (예컨대, 약 14 내지 19일)의 반감기를 가질 수 있다.
- [0183] 본 발명은 추가로 본원에 기재된 본 발명의 폴리펩티드, 핵산, 숙주 세포 및 조성물의 제조 또는 생성 방법과 관련 것이다.
- [0184] 일반적으로, 이러한 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:
- [0185] a) 폴리펩티드의 세트, 집합체 또는 라이브러리를 제공하는 단계; 및
- [0186] b) 상기 폴리펩티드의 세트, 집합체 또는 라이브러리를 CXCR2에 결합하고/하거나 이에 대한 친화도를 가질 수 있는 아미노산 서열에 대해 스크리닝하는 단계; 및
- [0187] c) CXCR2에 결합하고/하거나 이에 대한 친화도를 가질 수 있는 아미노산 서열을 단리하는 단계.
- [0188] 폴리펩티드의 세트, 집합체 또는 라이브러리는 이뮤노글로불린 서열 (본원에 기재된 바와 같음)의 세트, 집합체 또는 라이브러리, 예컨대 이뮤노글로불린 서열의 나이브 세트, 집합체 또는 라이브러리; 이뮤노글로불린 서열의 합성 또는 반-합성 세트, 집합체 또는 라이브러리; 및/또는 친화도 성숙에 적용된 이뮤노글로불린 서열의 세트,

집합체 또는 라이브러리일 수 있다.

- [0189] 또한, 이러한 방법에서, 폴리펩티드의 세트, 집합체 또는 라이브러리는 중쇄 가변 도메인 (예컨대,  $V_H$  도메인 또는  $V_{HH}$  도메인) 또는 경쇄 가변 도메인의 세트, 집합체 또는 라이브러리일 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드의 세트, 집합체 또는 라이브러리는 도메인 항체 또는 단일 도메인 항체의 세트, 집합체 또는 라이브러리일 수 있거나, 또는 도메인 항체 또는 단일 도메인 항체로서 기능할 수 있는 아미노산 서열의 세트, 집합체 또는 라이브러리일 수 있다.
- [0190] 상기 방법의 바람직한 측면에서, 폴리펩티드의 세트, 집합체 또는 라이브러리는 예를 들어 CXCR2 또는 이를 기초로 한 또는 이로부터 유도된 적합한 항원 결정기, 예컨대 그의 항원 부분, 단편, 영역, 도메인, 루프 또는 다른 에피토프로 적합하게 면역화시킨 포유동물, 예를 들어 라마로부터 유도된 이뮤노글로불린 서열의 면역 세트, 집합체 또는 라이브러리일 수 있다.
- [0191] 상기 방법에서, 펩티드 또는 폴리펩티드의 세트, 집합체 또는 라이브러리는 예컨대 스크리닝을 용이하게 하기 위해 파지, 파지미드, 리보솜 또는 적합한 미생물 (예컨대, 효모) 상에 디스플레이될 수 있다. 아미노산 서열 (의 세트, 집합체 또는 라이브러리)의 디스플레이 및 스크리닝에 적합한 방법, 기술 및 숙주 유기체는 예를 들어 본원의 추가의 개시내용을 기초로 하여 당업자에게 명백할 것이다. 또한, 문헌 [Hoogenboom in Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005)]을 참조한다.
- [0192] 또 다른 측면에서, 본 발명에 따른 이중과라토프성 폴리펩티드의 구축에 사용하기 위한 폴리펩티드를 생성하는 방법은 적어도 하기 단계를 포함한다:
- [0193] a) 폴리펩티드를 발현하는 세포의 집합체 또는 샘플을 제공하는 단계;
- [0194] b) 상기 세포의 집합체 또는 샘플을 CXCR2에 결합하고/하거나 이에 대한 친화도를 가질 수 있는 폴리펩티드를 발현하는 세포에 대해 스크리닝하는 단계; 및
- [0195] c) (i) 상기 폴리펩티드를 단리하거나; 또는 (ii) 상기 세포로부터 상기 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 단리한 후, 상기 폴리펩티드를 발현시키는 단계.
- [0196] 예를 들어, 목적하는 폴리펩티드가 이뮤노글로불린 서열일 경우에, 세포의 집합체 또는 샘플은 예를 들어 B-세포의 집합체 또는 샘플일 수 있다. 또한, 이러한 방법에서, 세포의 샘플은 예를 들어 CXCR2 또는 이를 기초로 한 또는 이로부터 유도된 적합한 항원 결정기, 예컨대 그의 항원 부분, 단편, 영역, 도메인, 루프 또는 다른 에피토프로 적합하게 면역화시킨 포유동물, 예를 들어 라마로부터 유도될 수 있다. 한 특정한 측면에서, 상기 항원 결정기는 세포의 부분, 영역, 도메인, 루프 또는 다른 세포의 에피토프(들)일 수 있다.
- [0197] 본원에서 확인된 본 발명의 바람직한 이중과라토프성 나노바디의 제조에서, 라마는 인간 CXCR2를 발현하는 포유동물 세포, 시노몰구스 CXCR2를 발현하는 포유동물 세포, 전장 인간 CXCR2를 코딩하는 DNA,  $\Delta 1-17$  인간 CXCR2를 코딩하는 DNA, 시노몰구스 CXCR2를 코딩하는 DNA, 및 표 5에 제시된 펩티드로 면역화되었다.
- [0198] 상기한 바와 같은 스크리닝 방법은 당업자에게 명백한 바와 같이 임의의 적합한 방식으로 수행될 수 있다. 예를 들어, EP 0 542 810, WO 05/19824, WO 04/051268 및 WO 04/106377을 참조한다. 단계 b)의 스크리닝은 바람직하게는 유동 세포측정법 기술, 예컨대 FACS를 이용하여 수행된다. 이를 위해, 예를 들어 문헌 [Lieby et al., Blood, Vol. 97, No. 12, 3820 (2001)]을 참조한다.
- [0199] 또 다른 측면에서, 본 발명에 따른 폴리펩티드의 구축에 사용하기 위한, CXCR2에 대해 지시되는 폴리펩티드를 생성하는 방법은 적어도 하기 단계를 포함할 수 있다:
- [0200] a) 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열의 세트, 집합체 또는 라이브러리를 제공하는 단계;
- [0201] b) 상기 핵산 서열의 세트, 집합체 또는 라이브러리를 CXCR2에 결합하고/하거나 이에 대한 친화도를 가질 수 있는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열에 대해 스크리닝하는 단계; 및
- [0202] c) 상기 핵산 서열을 단리한 후, 상기 폴리펩티드를 발현시키는 단계.
- [0203] 이러한 방법에서, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열의 세트, 집합체 또는 라이브러리는 예를 들어 이뮤노글로불린 서열의 나이드 세트, 집합체 또는 라이브러리를 코딩하는 핵산 서열의 세트, 집합체 또는 라이브러리; 이뮤노글로불린 서열의 합성 또는 반-합성 세트, 집합체 또는 라이브러리를 코딩하는 핵산 서열의 세트, 집합체 또는 라이브러리; 및/또는 친화도 성숙에 적용된 이뮤노글로불린 서열의 세트, 집합체 또는 라이브러리를 코딩하

는 핵산 서열의 세트, 집합체 또는 라이브러리일 수 있다.

- [0204] 또한, 이러한 방법에서, 핵산 서열의 세트, 집합체 또는 라이브러리는 중쇄 가변 도메인 (예컨대,  $V_H$  도메인 또는  $V_{HH}$  도메인) 또는 경쇄 가변 도메인의 세트, 집합체 또는 라이브러리를 코딩할 수 있다. 예를 들어, 핵산 서열의 세트, 집합체 또는 라이브러리는 도메인 항체 또는 단일 도메인 항체의 세트, 집합체 또는 라이브러리, 또는 도메인 항체 또는 단일 도메인 항체로서 기능할 수 있는 아미노산 서열의 세트, 집합체 또는 라이브러리를 코딩할 수 있다.
- [0205] 이러한 방법의 바람직한 측면에서, 핵산 서열의 세트, 집합체 또는 라이브러리는 예를 들어 CXCR2 또는 이를 기초로 한 또는 이로부터 유도된 적합한 항원 결정기, 예컨대 그의 항원 부분, 단편, 영역, 도메인, 루프 또는 다른 에피토프로 적합하게 면역화시킨 포유동물로부터 유도된 핵산 서열의 면역 세트, 집합체 또는 라이브러리일 수 있다. 한 특정한 측면에서, 상기 항원 결정기는 세포의 부분, 영역, 도메인, 루프 또는 다른 세포의 에피토프(들)일 수 있다.
- [0206] 본 발명의 폴리펩티드의 생성에서, 라마를 상기 기재된 바와 같은 항원으로 면역화시켰다.
- [0207] 상기 방법에서, 뉴클레오티드 서열의 세트, 집합체 또는 라이브러리는 예컨대 스크리닝을 용이하게 하기 위해 파지, 파지미드, 리보솜 또는 적합한 미생물 (예컨대, 효모) 상에 디스플레이될 수 있다. 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 (의 세트, 집합체 또는 라이브러리)의 디스플레이 및 스크리닝에 적합한 방법, 기술 및 숙주 유기체는 예를 들어 본원의 추가의 개시내용을 기초로 하여 당업자에게 명백할 것이다. 또한, 문헌 [Hoogenboom in Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005)]을 참조한다.
- [0208] 또 다른 측면에서, 본 발명에 따른 이중과라토프성 폴리펩티드에 사용될 수 있는, CXCR2에 대해 지시되는 폴리펩티드를 생성하는 방법은 적어도 하기 단계를 포함할 수 있다:
- [0209] a) 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열의 세트, 집합체 또는 라이브러리를 제공하는 단계;
- [0210] b) 상기 핵산 서열의 세트, 집합체 또는 라이브러리를, CXCR2에 결합하고/하거나 이에 대한 친화도를 가질 수 있고, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디, 예를 들어 서열 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47 또는 61에 의해 코딩되는 것을 교차-차단하거나 또는 교차-차단되는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열에 대해 스크리닝하는 단계; 및
- [0211] c) 상기 핵산 서열을 단리한 후, 상기 폴리펩티드를 발현시키는 단계.
- [0212] 본 발명은 또한 상기 방법에 의해, 또는 대안적으로 상기 방법 중 하나 및 상기 이뮤노글로불린 서열의 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열을 결정하고; 그 자체로 공지된 방식으로, 예컨대 적합한 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서의 발현에 의해 또는 화학적 합성에 의해 상기 아미노산 서열을 발현시키거나 합성하고, 이로부터 이중과라토프성 폴리펩티드를 구축하는 단계를 적어도 추가로 포함하는 방법에 의해 얻은 이중과라토프성 폴리펩티드에 관한 것이다.
- [0213] 상기 방법은 당업자에게 명백할 것이며, 아래에 보다 상세히 논의되는 바와 같은 임의의 적합한 방식으로 수행될 수 있다. 예를 들어, EP 0 542 810, WO 05/19824, WO 04/051268 및 WO 04/106377을 참조한다. 예를 들어, 단계 b)의 스크리닝은 바람직하게는 유동 세포측정법 기술, 예컨대 FACS를 이용하여 수행된다. 이를 위해, 예를 들어 문헌 [Lieby et al., Blood, Vol. 97, No. 12, 3820]을 참조한다. 특히, 국제 출원 WO 06/079372 (아블린크스 N.V.)에 기재된 소위 "나노클론™" 기술을 참조한다.
- [0214] CXCR2에 대해 지시되는  $V_{HH}$  서열 또는 나노바디 서열을 얻기 위한 또 다른 기술은 중쇄 항체를 발현할 수 있는 트랜스제닉 포유동물을 적합하게 면역화시키고 (즉, 면역 반응 및/또는 CXCR2에 대해 지시되는 중쇄 항체를 유도하기 위해), 상기  $V_{HH}$  서열 또는 나노바디 서열 (을 코딩하는 핵산 서열)을 함유하는 상기 트랜스제닉 포유동물로부터 적합한 생물학적 샘플 (예컨대, 혈액 샘플, 혈청 샘플 또는 B-세포의 샘플)을 얻고, 이어서 그 자체로 공지된 임의의 적합한 기술 (예컨대, 본원에 기재된 임의의 방법 또는 하이브리도마 기술)을 사용하여 상기 샘플로부터 시작하여 CXCR2에 대해 지시되는  $V_{HH}$  서열을 생성하는 것을 수반한다. 예를 들어, 이러한 목적을 위해, 중쇄 항체-발현 마우스 및 WO 02/085945, WO 04/049794 및 WO 06/008548 및 문헌 [Janssens et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006 Oct 10;103(41):15130-5]에 기재된 추가의 방법 및 기술이 이용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 중쇄 항체 발현 마우스는 임의의 적합한 (단일) 가변 도메인, 예컨대 천연 공급원 (예를 들어, 인간 (단일) 가변 도메인, 낙타류 (단일) 가변 도메인 또는 상어 (단일) 가변 도메인)으로부터의 (단일) 가

변 도메인, 및 예를 들어 합성 또는 반-합성 (단일) 가변 도메인을 갖는 중쇄 항체를 발현할 수 있다.

- [0215] 자연 발생  $V_H$  서열 또는 바람직하게는  $V_{H\infty}$  서열로부터 출발하여, 본 발명에 사용하기 위한 나노바디 및/또는 이를 코딩하는 핵산을 얻기 위한 다른 적합한 방법 및 기술은 당업자에게 명백할 것이고, 예를 들어 본원에 언급된 바와 같이 WO 08/00279의 64 페이지에 언급된 기술을 포함할 수 있다.
- [0216]  $V_{H\infty}$  도메인 또는 나노바디는 그의 FR 내의 하나 이상의 "특징 잔기"를 특징으로 할 수 있다. 특징 잔기는 낙타류, 예를 들어 라마 공급원으로부터의 FR을 특징으로 하는 잔기이다. 따라서, 특징 잔기는 치환, 바람직하게는 인간화 치환을 위한 바람직한 표적이다.
- [0217] 카바트 넘버링에 따르면, 특징 잔기는 나노바디의 위치 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 또는 108에 존재할 수 있다. 이러한 프레임워크 서열 및 다른 특징 잔기 (의 적합한 조합)의 비제한적 예는 WO 2008/020079의 65 내지 98 페이지에 제시되어 있고, 이들 페이지는 그 전부가 본원에 참조로 포함된다. 당업계에 공지된 다른 인간화 또는 부분 인간화된 서열도 고려되고, 본 발명에 포함된다.
- [0218] 이미 본원에 논의된 바와 같이, 본 발명에 사용하기 위한 나노바디는 자연 발생 인간  $V_H$  도메인의 상응하는 프레임워크 영역에 비해, 특히 DP-47의 상응하는 프레임워크 영역에 비해 하나 이상의 프레임워크 영역에 "하나 이상의 아미노산 차이" (본원에 정의된 바와 같음)를 가질 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 하나의 비제한적 측면에 따르면, 나노바디는 자연 발생 인간  $V_H$  도메인의 상응하는 프레임워크 영역에 비해, 특히 DP-47의 상응하는 프레임워크 영역에 비해 하나 이상의 특징 잔기 (위치 108, 103 및/또는 45의 잔기 포함)에 "하나 이상의 아미노산 차이" (본원에 정의된 바와 같음)를 가질 수 있다. 통상적으로, 나노바디는 하나 이상의 FR2 및/또는 FR4, 특히 FR2 및/또는 FR4의 하나 이상의 특징 잔기 (다시, 위치 108, 103 및/또는 45의 잔기 포함)에서 자연 발생  $V_H$  도메인과 하나 이상의 상기 아미노산 차이를 가질 것이다.
- [0219] 또한, 본 발명의 인간화된 나노바디는 본원에 정의된 것일 수 있지만, 자연 발생  $V_{H\infty}$  도메인의 상응하는 프레임워크 영역에 비해 하나 이상의 프레임워크 영역에 "하나 이상의 아미노산 차이" (본원에 정의된 바와 같음)를 갖는다. 보다 구체적으로, 본 발명의 하나의 비제한적 측면에 따르면, 인간화된 또는 달리 서열 최적화된 나노바디는 본원에 정의된 것일 수 있지만, 자연 발생  $V_{H\infty}$  도메인의 상응하는 프레임워크 영역에 비해 하나 이상의 특징 잔기 (위치 108, 103 및/또는 45의 잔기 포함)에 "하나 이상의 아미노산 차이" (본원에 정의된 바와 같음)를 갖는다. 통상적으로, 인간화된 또는 달리 서열 최적화된 나노바디는 하나 이상의 FR2 및/또는 FR4, 특히 FR2 및/또는 FR4의 하나 이상의 특징 잔기 (다시, 위치 108, 103 및/또는 45의 잔기 포함)에서 자연 발생  $V_{H\infty}$  도메인과 하나 이상의 상기 아미노산 차이를 가질 것이다.
- [0220] 본원의 개시내용으로부터 명백하게 되는 바와 같이, 또한 본원에 정의된 본 발명의 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인의 천연 또는 합성 유사체, 돌연변이체, 변이체, 대립유전자, 상동체 및 오르토로그 (본원에서 집합적으로 "유사체"로 지칭됨), 특히 서열 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47, 61, 53, 54, 46, 69, 68, 67 또는 66의 이중과라토프성 나노바디의 유사체가 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [0221] 일반적으로, 상기 유사체에서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 본원에 정의된 본 발명의 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인에 비해 치환, 결실 및/또는 부가될 수 있다. 이러한 치환, 삽입 또는 결실은 하나 이상의 프레임워크 영역에서 및/또는 하나 이상의 CDR에서 이루어질 수 있다. 이러한 치환, 삽입 또는 결실이 하나 이상의 프레임워크 영역에서 이루어지는 경우에, 이들은 하나 이상의 특징 잔기에서 및/또는 프레임워크 잔기 내의 하나 이상의 다른 위치에서 이루어질 수 있지만, 특징 잔기에서의 치환, 삽입 또는 결실은 일반적으로 (이들이 본원에 기재된 적합한 인간화 치환이 아닌 한) 덜 바람직하다.
- [0222] 비제한적 예로서, 치환은 예를 들어 보존적 치환 (본원에 기재된 바와 같음)일 수 있고/있거나 아미노산 잔기는 또 다른  $V_{H\infty}$  도메인 내의 동일한 위치에서 자연 발생하는 또 다른 아미노산 잔기로 교체될 수 있지만 (상기 치환의 일부 비제한적 예에 대해서는 WO 2008/020079 참조), 본 발명은 일반적으로 이로 제한되지 않는다. 따라서, 예를 들어 본 발명의 이중과라토프성 나노바디에 사용하기 위한 나노바디의 특성을 개선하거나 또는 적어도 본 발명의 목적하는 특성 또는 목적하는 특성의 균형 또는 조합을 너무 많이 (즉, 나노바디 또는 이중과라토프성 나노바디가 더 이상 그의 의도되는 용도에 적합하지 않을 정도로) 손상시키지 않는 임의의 하나 이상의 치환, 결실 또는 삽입, 또는 그의 임의의 조합이 본 발명의 범위 내에 포함된다. 당업자는 일반적으로 본원의 개시내용을 기초로 하고, 예를 들어 제한된 수의 가능한 치환을 도입하고 이와 같이 수득한 나노바디의 특성에 대한

그의 영향을 결정하는 것을 수반할 수 있는 제한된 정도의 통상적인 실험을 임의로 수행한 후에, 적합한 치환, 결실 또는 삽입, 또는 이들의 적합한 조합을 결정하고 선택할 수 있을 것이다.

- [0223] 예를 들어, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드를 발현하기 위해 사용되는 숙주 유기체에 따라, 상기 결실 및/또는 치환은 번역후 변형을 위한 하나 이상의 부위 (예컨대, 하나 이상의 글리코실화 부위)가 제거되는 방식으로 설계될 수 있고, 이는 당업자의 능력 범위 내에 속할 것이다. 대안적으로, 치환 또는 삽입은 예를 들어 부위-특이적 PEG화 (다시 본원에 기재된 바와 같음)를 허용하기 위해, 기능적 기 (본원에 기재된 바와 같음)의 부착을 위한 하나 이상의 부위를 도입하도록 설계될 수 있다.
- [0224] 본원에서 일반적으로, "인간화" 치환을 비롯하여 천연 서열 내에 존재하지 않는 특정 특성 또는 구조적 특성을 지지하기 위해 아미노산 서열 내의 치환, 삽입 또는 결실을 용이하게 하는 것은 "서열 최적화"로 언급된다. 이와 관련하여, 항목 (y)의 본원의 정의 섹션을 참조할 수 있다.
- [0225] 유사체는 바람직하게는 이들이 본 발명의 이중과라토프성 나노바디에 대해 본원에 정의된 친화도 (본원에 추가로 기재된 바와 같이  $K_D$ -값 (실제 또는 겉보기),  $K_A$ -값 (실제 또는 겉보기),  $k_{on}$ -비율 및/또는  $k_{off}$ -비율로서, 또는 대안적으로  $IC_{50}$  값으로서 적합하게 측정 및/또는 표현된)로 CXCR2에 결합할 수 있도록 하는 것이다.
- [0226] 또한, 유사체는 바람직하게는 이들이 본원에 기재된 바와 같은 이중과라토프성 나노바디의 유리한 특성을 보유하도록 하는 것이다.
- [0227] 또한, 한 바람직한 측면에 따르면, 유사체는 서열 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47, 61, 53, 54, 46, 69, 68, 67 또는 66의 이중과라토프성 나노바디 중 하나에 대해 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 예컨대 95% 또는 99% 이상 또는 그 초과인 서열 동일성 정도를 갖고/갖거나; 바람직하게는 최대 20, 바람직하게는 최대 10, 훨씬 더 바람직하게는 최대 5, 예컨대 4, 3, 2 또는 오직 1개의 아미노산 차이 (본원에 정의된 바와 같음)를 갖는다.
- [0228] 또한, 유사체의 프레임워크 서열 및 CDR은 바람직하게는 이들이 본원에 정의된 바람직한 측면에 따르도록 하는 것이다. 보다 일반적으로, 본원에 기재된 바와 같이, 유사체는 (a) 위치 108에 Q; 및/또는 (b) 위치 45에 하전된 아미노산 또는 시스테인 잔기, 바람직하게는 위치 44에 E, 보다 바람직하게는 위치 44에 E 및 위치 45에 R; 및/또는 (c) 위치 103에 P, R 또는 S를 가질 것이다.
- [0229] 본 발명의 이중과라토프성  $V_H$  도메인 또는 나노바디의 유사체의 한 바람직한 부류는 (즉, 자연 발생 나노바디의 서열에 비해) 인간화되었다. 언급한 바와 같이, 상기 인간화는 일반적으로 자연 발생  $V_H$ 의 서열 내의 하나 이상의 아미노산 잔기를 인간  $V_H$  도메인, 예컨대 인간  $V_H3$  도메인 내의 동일한 위치에서 발생하는 아미노산 잔기로 치환하는 것을 수반한다. 가능한 인간화 치환의 예는 본원의 표 20, 22, 24, 26, 28 및 30에 구체적으로 개시되지만, 나노바디의 서열과 자연 발생 인간  $V_H$  도메인 서열의 비교로부터 및 본원에 이미 개시된 WO 2008/020079의 개시내용으로부터 인간화 치환의 다른 조합이 당업자에게 명백할 것이다.
- [0230] 일반적으로, 인간화의 결과로서, 본 발명의 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인, 특히 나노바디는 본원에 기재된 본 발명의 나노바디의 유리한 특성을 계속 보유하면서 보다 "인간-유사" 형태로 될 수 있다. 그 결과, 상기 인간화된 나노바디는 상응하는 자연 발생  $V_H$  도메인에 비해 몇몇 이점, 예컨대 감소된 면역원성을 가질 수 있다. 다시, 본원의 개시내용을 기초로 하고 임의의 제한된 정도의 통상적인 실험을 수행한 후에, 당업자는 한편으로 인간화 치환에 의해 제공되는 유리한 특성과 다른 한편으로 자연 발생  $V_H$  도메인의 유리한 특성 사이의 목적하는 또는 적합한 균형을 최적화하거나 달성하는 인간화 치환 또는 인간화 치환의 적합한 조합을 만들 수 있다.
- [0231] 본 발명의 이중과라토프성 나노바디에 포함시키기 위한 나노바디는 임의의 프레임워크 잔기(들)에서, 예컨대 하나 이상의 특징 잔기 (본원에 정의된 바와 같음)에서 또는 하나 이상의 다른 프레임워크 잔기 (즉, 비-특징 잔기) 또는 그의 임의의 적합한 조합에서 적합하게 인간화될 수 있다. "P,R,S-103 군" 또는 "KERE 군"의 나노바디에 대한 한 바람직한 인간화 치환은 Q108의 L108로의 치환이다. 또한, "GLEW 부류"의 나노바디는 하나 이상의 다른 특징 잔기가 낙타류 (낙타화) 치환 (본원에 정의된 바와 같음)을 보유한다면 Q108의 L108로의 치환에 의해 인간화될 수 있다. 예를 들어, 상기 언급된 바와 같이, 인간화된 나노바디의 하나의 특히 바람직한 부류는 위치 44-47에 GLEW 또는 GLEW-유사 서열; 위치 103에 P, R 또는 S (특히 R), 및 위치 108에 L을 갖는다.
- [0232] 인간화된 및 다른 유사체, 및 그를 코딩하는 핵산 서열은 그 자체로 공지된 임의의 방식으로, 예를 들어 하나

이상의 WO 08/020079의 103 및 104 페이지에 언급된 기술을 이용하여 제공될 수 있다.

- [0233] 본원에 언급된 바와 같이, 본 발명의 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 (그의 유사체 포함)은 본 발명의 나노바디의 서열을 제공하고/하거나 이와 같이 수득한 서열에 나노바디의 유리한 특성을 부여하기 위해, 인간  $V_H$  서열 (즉, 아미노산 서열 또는 상응하는 뉴클레오티드 서열)로부터, 예를 들어 인간  $V_H3$  서열, 예컨대 DP-47, DP-51 또는 DP-29로부터 출발하여, 하나 이상의 낙타화 치환의 도입 (즉, 상기 인간  $V_H$  도메인의 아미노산 서열 내의 하나 이상의 아미노산 잔기를  $V_H$  도메인의 상응하는 위치에서 발생하는 아미노산 잔기로 변경)에 의해 설계 및/또는 제조될 수 있음도 당업자에게 명백할 것이다. 다시, 이는 일반적으로 인간  $V_H$  도메인에 대한 아미노산 서열 및/또는 뉴클레오티드 서열을 출발점으로 사용하여, 이전의 단락에서 언급된 다양한 방법 및 기술을 이용하여 수행될 수 있다.
- [0234] 일부 바람직하지만 비제한적인 낙타화 치환은 WO 2008/020079로부터 유도될 수 있다. 또한, 하나 이상의 특정 잔기에서의 낙타화 치환이 일반적으로 하나 이상의 다른 아미노산 위치에서의 치환보다 목적하는 특성에 대해 더 큰 영향을 갖지만, 그 둘 및 이들의 임의의 적합한 조합이 본 발명의 범위 내에 포함됨이 명백할 것이다. 예를 들어, 이미 적어도 일부의 목적하는 특성을 부여하는 하나 이상의 낙타화 치환을 도입한 후, 상기 특성을 추가로 개선하고/하거나 추가의 유리한 특성을 부여하는 추가의 낙타화 치환을 도입하는 것이 가능하다. 다시, 당업자는 일반적으로 본원의 개시내용을 기초로 하고, 예를 들어 제한된 수의 가능한 낙타화 치환을 도입하고 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인의 (즉, 원래의  $V_H$  도메인에 비해) 유리한 특성이 얻어지거나 개선되는지 결정하는 것을 수반할 수 있는 임의의 제한된 정도의 통상적인 실험을 수행한 후, 적합한 낙타화 치환 또는 낙타화 치환의 적합한 조합을 결정하고 선택할 수 있을 것이다. 그러나, 일반적으로, 상기 낙타화 치환은 바람직하게는 생성되는 아미노산 서열이 적어도 (a) 위치 108에 Q; 및/또는 (b) 위치 45에 하전된 아미노산 또는 시스테인 잔기, 바람직하게는 위치 44에 E, 보다 바람직하게는 위치 44에 E 및 위치 45에 R; 및/또는 (c) 위치 103에 P, R 또는 S; 및 임의로 하나 이상의 추가의 낙타화 치환을 함유하도록 하는 것이다. 보다 바람직하게는, 낙타화 치환은 이들이 본 발명에 사용하기 위한 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 및/또는 그의 유사체 (본원에 정의된 바와 같음), 예컨대 인간화된 유사체 및/또는 바람직하게는 선행 단락에서 규정된 바와 같은 유사체를 생성하도록 하는 것이다.
- [0235] 또한, 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인, 예컨대 나노바디는, 특성이 희귀하지만, 그럼에도 불구하고  $V_H$  도메인 폴드와 구조적으로 적합한 치환의 도입에 의해  $V_H$  도메인으로부터 유도될 수 있다. 예를 들어, 비제한적으로, 이들 치환은 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 위치 35의 Gly, 위치 37의 Ser, Val 또는 Thr, 위치 39의 Ser, Thr, Arg, Lys, His, Asp 또는 Glu, 위치 45의 Glu 또는 His, 위치 47의 Trp, Leu, Val, Ala, Thr, 또는 Glu, 위치 50의 S 또는 R (문헌 [Barthelemy et al. J Biol Chem. 2008 Feb 8;283(6):3639-54. Epub 2007 Nov 28]).
- [0236] 본 발명은 또한 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드의 유도체를 포함한다. 이러한 유도체는 일반적으로 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드의 및/또는 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드를 형성하는 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형, 특히 화학적 및/또는 생물학적 (예를 들어, 효소에 의한) 변형에 의해 수득할 수 있다.
- [0237] 상기 변형의 예, 및 상기 방식으로 (즉, 단백질 백본 상의, 그러나 바람직하게는 측쇄 상의) 변형될 수 있는 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기의 예, 상기 변형을 도입하기 위해 사용될 수 있는 방법 및 기술 및 상기 변형의 잠재적인 용도 및 이점은 당업자에게 명백할 것이다.
- [0238] 예를 들어, 상기 변형은 하나 이상의 기능적 기, 잔기 또는 모이어티의 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드 내로 또는 그 상으로의, 특히 하나 이상의 목적하는 특성 또는 기능성을 부여하는 하나 이상의 기능적 기, 잔기 또는 모이어티의 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드로의 도입 (예를 들어, 공유 연결에 의한 또는 다른 적합한 방식으로)을 수반할 수 있다. 상기 기능적 기의 예는 당업자에게 명백할 것이다.
- [0239] 예를 들어, 이러한 변형은 본 발명의 폴리펩티드의 반감기, 용해도 및/또는 흡수를 증가시키고, 본 발명의 폴리펩티드의 면역원성 및/또는 독성을 감소시키고, 본 발명의 폴리펩티드의 임의의 바람직하지 않은 부작용을 제거하거나 약화시키고/시키거나, 다른 유익한 특성을 부여하고/하거나 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 및/또는 폴리펩티드의 원하지 않는 특성을 감소시키거나; 또는 상기 중 2개 이상의 임의의 조합을 제공하는 하나 이상의 기능적 기의 도입 (예를 들어, 공유 결합에 의해 또는 임의의 다른 적합한 방식으로)을 포함할 수 있다. 이러한 기능적 기 및 이를 도입하기 위한 기술의 예는 당업자에게 명백할 것이고, 일반적으로 당업계에 공지된 모든

기능적 기 뿐만 아니라 제약 단백질의 변형을 위해, 특히 항체 또는 항체 단편 (ScFv 및 단일 도메인 항체 포함)의 변형을 위해 그 자체로 공지된 기능적 기 및 기술을 포함할 수 있고, 이에 대해서는 예를 들어 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980)]을 참조한다. 이러한 기능적 기는 예를 들어 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드에 직접 (예를 들어, 공유), 또는 임의로 당업자에게 명백할 적합한 링커 또는 스페이서를 통해 연결될 수 있다.

[0240] 또 다른, 통상적으로 덜 바람직한 변형은 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드를 발현하기 위해 사용되는 숙주 세포에 따라, 통상적으로 공동-번역 및/또는 번역후 변형의 일부로서 N-연결된 또는 O-연결된 글리코실화를 포함한다.

[0241] 또 다른 변형은 표지된 폴리펩티드 또는 나노바디의 의도되는 용도에 따라 하나 이상의 검출가능한 표지 또는 다른 신호-발생 기 또는 모이어티의 도입을 포함할 수 있다. 적합한 표지 및 이를 부착, 사용 및 검출하기 위한 기술은 당업자에게 명백할 것이고, 예를 들어 형광 표지, 인광 표지, 화학발광 표지, 생물발광 표지, 방사성 동위원소, 금속, 금속 킬레이트, 금속 양이온, 발색단 및 효소, 예컨대 WO 08/020079의 109 페이지에 언급된 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 다른 적합한 표지는 당업자에게 명백할 것이고, 예를 들어 NMR 또는 ESR 분광분석법을 이용하여 검출될 수 있는 모이어티를 포함한다.

[0242] 본 발명의 이러한 표지된 이중과라토프성 나노바디 및 폴리펩티드는 예를 들어 특이적 표지의 선택에 따라, 시험관내, 생체내 또는 계내 검정 (그 자체로 공지된 면역검정, 예컨대 ELISA, RIA, EIA 및 다른 "샌드위치 검정" 등 포함) 뿐만 아니라 생체내 진단 및 영상화 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0243] 당업자에게 명백한 바와 같이, 또 다른 변형은 예를 들어 상기 언급된 금속 또는 금속 양이온 중 하나를 킬레이트화하기 위한 킬레이트화 기의 도입을 수반할 수 있다. 적합한 킬레이트화 기는 예를 들어 디에틸렌트리아민 펜타아세트산 (DTPA) 또는 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA)을 비제한적으로 포함한다.

[0244] 또 다른 변형은 특이적 결합 쌍, 예컨대 비오틴-(스트렙트)아비딘 결합 쌍의 한 부분인 기능적 기의 도입을 포함할 수 있다. 이러한 기능적 기는 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드 또는 나노바디를 결합 쌍의 다른 절반에 결합된 또 다른 단백질, 폴리펩티드 또는 화합물에, 즉 결합 쌍의 형성을 통해 연결하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디는 비오틴에 접합되고, 아비딘 또는 스트렙타비딘에 접합된 또 다른 단백질, 폴리펩티드, 화합물 또는 담체에 연결될 수 있다. 예를 들어, 이러한 접합된 이중과라토프성 나노바디는 예를 들어 검출가능한 신호-발생체가 아비딘 또는 스트렙타비딘에 접합된 진단 시스템에서 리포터로서 사용될 수 있다. 이러한 결합 쌍은 예를 들어 본 발명의 이중과라토프성 나노바디를 제약 목적에 적합한 담체를 포함하는 담체에 결합시키기 위해 사용될 수도 있다. 하나의 비제한적 예는 문헌 [Cao and Suresh, Journal of Drug Targetting, 8, 4, 257 (2000)]에 기재된 리포솜 제제이다. 이러한 결합 쌍은 또한 치료 활성제를 본 발명의 나노바디에 연결하기 위해 사용될 수 있다.

[0245] 일부 용도를 위해, 특히 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드 또는 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인이 그에 대해 지시되는, (예를 들어, 암의 치료에서) CXCR2 표적을 발현하는 세포를 사멸시키거나 또는 상기 세포의 성장 및/또는 증식을 감소시키거나 지연시키는 것이 의도되는 용도를 위해, 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드는 또한 독소 또는 독성 잔기 또는 모이어티에 연결될 수 있다. 예를 들어, 세포독성 화합물을 제공하기 위해 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드에 연결될 수 있는 독성 모이어티, 화합물 또는 잔기의 예는 당업자에게 명백할 것이고, 예를 들어 상기 인용된 선행 기술 및/또는 본원의 추가의 기재에서 찾아볼 수 있다. 한 예는 WO 03/055527에 기재된 소위 ADEPT™ 기술이다.

[0246] 다른 잠재적인 화학적 및 효소에 의한 변형은 당업자에게 명백할 것이다. 상기 변형은 또한 연구 목적을 위해 (예를 들어, 기능-활성 관계를 연구하기 위해) 도입될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Lundblad and Bradshaw, Biotechnol. Appl. Biochem., 26, 143-151 (1997)]을 참조한다.

[0247] 바람직하게는, 유도체는 이들이 본 발명의 이중과라토프성 나노바디에 대해 본원에 정의된 친화도 (본원에 추가로 기재된 바와 같이  $K_D$ -값 (실제 또는 겉보기),  $K_A$ -값 (실제 또는 겉보기),  $k_{on}$ -비율 및/또는  $k_{off}$ -비율로서, 또는 대안적으로  $IC_{50}$  값으로서 적합하게 측정 및/또는 표현됨)로 CXCR2에 결합하도록 하는 것이다.

[0248] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명은 또한 본 발명의 하나 이상의 이중과라토프성 폴리펩티드로 본질적으로 이루어지거나 이를 포함하는 단백질 또는 폴리펩티드에 관한 것이다. "본질적으로 이루어지는"은 본 발명의 폴리펩티드의 아미노산 서열이 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드의 아미노산 서열과 정확하게 동일하거나, 또는

제한된 수의 아미노산 잔기, 예컨대 1-20개 아미노산 잔기, 예를 들어 1-10개 아미노산 잔기, 바람직하게는 1-6개 아미노산 잔기, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 아미노산 잔기가 아미노 말단 단부에, 카르복시 말단 단부에, 또는 이중과라토프성 폴리펩티드의 아미노산 서열의 아미노 말단 단부 및 카르복시 말단 단부 둘 다에 부가된 본 발명의 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열에 대응함을 의미한다.

- [0249] 상기 아미노산 잔기는 폴리펩티드의 (생물학적) 특성을 변화, 변경하거나 달리 영향을 주거나 또는 주지 않을 수 있고, 그에 대해 추가의 기능성을 추가하거나 추가하지 않을 수 있다. 예를 들어, 이러한 아미노산 잔기는:
- [0250] - 예를 들어 이중 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서 발현의 결과로서 N-말단 Met 잔기를 포함할 수 있다.
- [0251] - 합성시에 숙주 세포로부터 이중과라토프성 폴리펩티드의 분비를 지시하는 신호 서열 또는 리더 서열을 형성할 수 있다. 적합한 분비 리더 펩티드는 당업자에게 명백할 것이고, 본원에서 추가로 기재될 수 있다. 통상적으로, 이러한 리더 서열은 이중과라토프성 폴리펩티드의 N-말단에 연결될 것이다.
- [0252] - 이중과라토프성 폴리펩티드가 특정 기관, 조직, 세포, 또는 세포의 일부 또는 구획을 향해 유도되고/되거나 이를 투과하거나 도입되도록 허용하고/하거나, 이중과라토프성 폴리펩티드가 생물학적 장벽, 예컨대 세포 막, 세포 층, 예컨대 상피 세포의 층, 고형 종양을 포함하는 종양, 또는 혈액-뇌-장벽을 투과하거나 가로지르도록 허용하는 서열 또는 신호를 형성할 수 있다. 이러한 아미노산 서열의 예는 당업자에게 명백할 것이고, WO 08/020079의 112 페이지의 단락 c)에서 언급된 것을 포함한다.
- [0253] - 예를 들어 상기 서열 또는 잔기에 대해 지시되는 친화도 기술을 이용하여 이중과라토프성 나노바디의 정제를 허용하거나 용이하게 하는 "태그", 예를 들어 아미노산 서열 또는 잔기를 형성할 수 있다. 이후에, 상기 서열 또는 잔기는 이중과라토프성 폴리펩티드 서열을 제공하기 위해 제거될 수 있다 (예를 들어, 화학적 또는 효소에 의한 절단에 의해) (이를 위해, 태그는 절단가능한 링커 서열을 통해 이중과라토프성 폴리펩티드 서열에 임의로 연결되거나 또는 절단가능한 모티프를 함유할 수 있음). 이러한 잔기의 일부의 바람직한, 그러나 비제한적 예는 다수의 히스티딘 잔기, 글루타티온 잔기 및 myc-태그 (예를 들어, WO 06/12282의 서열 31 참조)이다.
- [0254] - 기능화된 및/또는 기능적 기의 부착 부위로서 기능할 수 있는 하나 이상의 아미노산 잔기일 수 있다. 적합한 아미노산 잔기 및 기능적 기는 당업자에게 명백할 것이고, 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드 또는 나노바디의 유도체에 대해 본원에 언급된 아미노산 잔기 및 기능적 기를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0255] 또 다른 측면에 따르면, 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드는 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 및 하나 이상의 추가의 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 제공하기 위해, 그의 아미노 말단 단부에서, 그의 카르복시 말단 단부에서, 또는 그의 아미노 말단 단부 및 그의 카르복시 말단 단부 둘 다에서 하나 이상의 추가의 펩티드 또는 폴리펩티드에 융합된 본 발명의 이중과라토프성 나노바디를 포함한다. 이러한 융합체는 또한 "나노바디 융합체"로서 본원에 언급될 것이다.
- [0256] 바람직하게는, 추가의 펩티드 또는 폴리펩티드는 하나 이상의 목적하는 특성 또는 기능성을 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드에 부여하도록 하는 것이다.
- [0257] 예를 들어, 추가의 펩티드 또는 폴리펩티드는 또한 추가의 결합 부위를 제공할 수 있고, 이 결합 부위는 임의의 목적하는 단백질, 폴리펩티드, 항원, 항원 결정기 또는 에피토프 (본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드가 그에 대해 지시되는 동일한 단백질, 폴리펩티드, 항원, 항원 결정기 또는 에피토프, 또는 상이한 단백질, 폴리펩티드, 항원, 항원 결정기 또는 에피토프를 포함하나 이에 제한되지는 않음)에 대해 작용할 수 있다.
- [0258] 이러한 펩티드 또는 폴리펩티드의 예는 당업자에게 명백할 것이고, 일반적으로 통상적인 항체 및 그의 단편 (ScFv 및 단일 도메인 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않음)을 기초로 한 펩티드 융합체에 사용되는 모든 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Holliger and Hudson, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136 (2005)]을 참조한다.
- [0259] 예를 들어, 이러한 펩티드 또는 폴리펩티드는 본 발명의 폴리펩티드 자체에 비해 본 발명의 폴리펩티드의 반감기, 용해도, 또는 흡수를 증가시키고, 면역원성 또는 독성을 감소시키고, 바람직하지 않은 부작용을 제거하거나 약화시키고/시키거나 다른 유익한 특성을 부여하고/하거나 원하지 않는 특성을 감소시키는 아미노산 서열일 수 있다. 이러한 펩티드 및 폴리펩티드의 일부의 비제한적 예는 혈청 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민 (예를 들어, WO 00/27435 참조) 또는 합텐 분자 (예를 들어, 순환 항체에 의해 인식되는 합텐, 예를 들어 WO 98/22141 참조)이다.

- [0260] 특히, 이뮤노글로불린의 단편 (예컨대,  $V_H$  도메인)을 혈청 알부민 또는 그의 단편에 연결하는 것이 반감기를 증가시키기 위해 사용될 수 있음이 선행 기술에 기재되어 있다. WO 00/27435 및 WO 01/077137을 참조한다. 본 발명에 따르면, 이중과라토프성 폴리펩티드, 바람직하게는 본 발명의 이중과라토프성 나노바디는 바람직하게는 혈청 알부민에 (또는 그의 적합한 단편에) 직접 또는 본 발명의 폴리펩티드가 유전자 융합체 (단백질)로서 발현될 수 있도록 적합한 링커를 통해, 특히 적합한 펩티드를 통해 연결된다. 한 구체적 측면에 따르면, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디는 혈청 알부민의 도메인 III 또는 그의 일부를 적어도 포함하는 혈청 알부민의 단편에 연결될 수 있다. 예를 들어, 아블린크스 N.V.의 WO 07/112940을 참조한다.
- [0261] 대안적으로, 본원에서 이미 논의된 바와 같이, 추가의 펩티드 또는 폴리펩티드는 혈청 내의 증가된 반감기를 제공하도록 혈청 단백질 (예컨대, 예를 들어 인간 혈청 알부민 또는 또 다른 혈청 단백질, 예컨대 IgG)에 대해 지시되는 추가의 결합 부위 또는 결합 단위를 제공할 수 있다. 이러한 아미노산 서열은 예를 들어 아래에 기재된 나노바디 뿐만 아니라 WO 91/01743, WO 01/45746 및 WO 02/076489에 기재된 작은 펩티드 및 결합 단백질 및 WO 03/002609 및 WO 04/003019에 기재된 dAb를 포함한다. 또한, 문헌 [Harmsen et al., Vaccine, 23 (41); 4926-42, 2005] 뿐만 아니라 EP 0 368 684 뿐만 아니라 WO 08/028977, WO 08/043821, WO 08/043822 (아블린크스 N.V.) 및 2006년 12월 5일에 출원된 아블린크스 N.V.의 미국 가출원 (표제: "Peptides capable of binding to serum proteins") (또한 PCT/EP2007/063348 참조)을 참조한다.
- [0262] 이러한 펩티드 또는 폴리펩티드는 특히 혈청 알부민 (보다 특히 인간 혈청 알부민) 및/또는 IgG (보다 특히 인간 IgG)에 대해 작용할 수 있다. 예를 들어, 이러한 아미노산 서열은 (인간) 혈청 알부민에 대해 지시되는 아미노산 서열 및 혈청 알부민의 FcRn에 대한 결합에 관여하지 않는 (인간) 혈청 알부민 상의 아미노산 잔기에 결합할 수 있는 아미노산 서열 (예를 들어, WO 06/0122787 참조) 및/또는 혈청 알부민의 도메인 III의 일부를 형성하지 않는 혈청 알부민 상의 아미노산 잔기에 결합할 수 있는 아미노산 서열 (다시 예를 들어 WO 06/0122787 참조); 증가된 반감기를 갖거나 제공할 수 있는 아미노산 서열 (예를 들어, 아블린크스 N.V.의 WO 08/028977 참조); 하나 이상의 종의 포유동물, 및 특히 하나 이상의 종의 영장류 (예컨대, 비제한적으로, 마카카 속으로부터의 원숭이 (예컨대, 및 특히, 시노몰구스 원숭이 (마카카 파시쿨라리스) 및/또는 레서스 원숭이 (마카카 무라타)) 및 개코원숭이 (파피오 우르시누스))로부터의 혈청 알부민과 교차-반응성인, 인간 혈청 알부민에 대해 지시되는 아미노산 서열 (다시 WO 08/028977 참조); pH 비의존성 방식으로 혈청 알부민에 결합할 수 있는 아미노산 서열 (예를 들어, 아블린크스 N.V.의 WO 08/043821 (표제: "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") 참조) 및/또는 조건 결합제인 아미노산 서열 (예를 들어, 아블린크스 N.V.의 WO 08/043822 (표제: "Amino acid sequences that bind to a desired molecule in a conditional manner") 참조)일 수 있다.
- [0263] 또 다른 측면에 따르면, 하나 이상의 추가의 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 서열은 종래의 4쇄 항체 (특히 인간 항체) 및/또는 중쇄 항체의 하나 이상의 부분, 단편 또는 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 통상적으로 덜 바람직하지만, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디는 다시 임의로 링커 서열 (다른 (단일) 도메인 항체, 예컨대 문헌 [Ward et al.]에 기재된 dAb를 포함하나 이에 제한되지는 않음)을 통해 통상적인 (바람직하게는 인간)  $V_H$  또는  $V_L$  도메인에 또는  $V_H$  또는  $V_L$  도메인의 천연 또는 합성 유사체에 연결될 수 있다.
- [0264] 이중과라토프성 폴리펩티드 또는 나노바디는 또한 임의로 링커 서열을 통해 하나 이상의 (바람직하게는 인간)  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  및/또는  $C_{H3}$  도메인에 연결될 수 있다. 예를 들어, 적합한  $C_{H1}$  도메인에 연결된 이중과라토프성 나노바디는 예를 들어 통상적인 Fab 단편 또는  $F(ab')_2$  단편에 유사하지만 통상적인  $V_H$  도메인의 하나 또는  $(F(ab')_2$  단편의 경우에) 하나 또는 둘 다가 본 발명의 이중과라토프성 나노바디에 의해 교체된 항체 단편/구조를 생성하기 위해 적합한 경쇄와 함께 사용될 수 있다. 또한, 2개의 이중과라토프성 폴리펩티드는 생체내에서 증가된 반감기를 갖는 구축물을 제공하기 위해  $C_{H3}$  도메인 (임의로 링커를 통해)에 연결될 수 있다.
- [0265] 본 발명의 폴리펩티드의 한 구체적인 측면에 따르면, 본 발명의 하나 이상의 이중과라토프성 폴리펩티드 또는 나노바디는 하나 이상의 불변 도메인 (예를 들어, Fc 부분의 일부로서/Fc 부분을 형성하기 위해 사용될 수 있는 2 또는 3 불변 도메인)에, Fc 부분에 및/또는 하나 이상의 이펙터 기능을 본 발명의 폴리펩티드에 부여하고/하거나 하나 이상의 Fc 수용체에 결합하는 능력을 부여할 수 있는 하나 이상의 항체 부분, 단편 또는 도메인에 (임의로 적합한 링커 또는 힌지 영역을 통해) 연결될 수 있다. 예를 들어, 이러한 목적을 위해 이에 제한되지 않으면서, 하나 이상의 추가의 펩티드 또는 폴리펩티드는 항체, 예컨대 중쇄 항체 (본원에 기재된 바와 같음), 보다 바람직하게는 통상적인 인간 4쇄 항체로부터의 하나 이상의  $C_{H2}$  및/또는  $C_{H3}$  도메인을 포함할 수 있고/있거

나; 예를 들어 IgG (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4), IgE 또는 또 다른 인간 Ig, 예컨대 IgA, IgD 또는 IgM로부터의 Fc 영역 (의 일부)를 형성할 수 있다. 예를 들어, WO 94/04678에는 낙타류 V<sub>H</sub> 도메인 또는 그의 인간화된 유도체 (즉, 나노바디)를 포함하는 중쇄 항체가 기재되어 있고, 인간화된 유도체에서 낙타류 C<sub>H</sub>2 및/또는 C<sub>H</sub>3 도메인은 각각 나노바디 및 인간 C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 도메인을 포함하는 (그러나, C<sub>H</sub>1 도메인은 포함하지 않는) 2개의 중쇄로 이루어지는 이뮤노글로불린을 제공하기 위해 인간 C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 도메인에 의해 교체되었고, 상기 이뮤노글로불린은 C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 도메인에 의해 제공되는 이펙터 기능을 갖고 임의의 경쇄가 존재하지 않은 경우에도 기능할 수 있다. 이펙터 기능을 제공하기 위해 본 발명의 나노바디에 적합하게 연결될 수 있는 다른 아미노산 서열은 당업자에게 명백할 것이고, 목적하는 이펙터 기능(들)을 기초로 하여 선택될 수 있다. 예를 들어, WO 04/058820, WO 99/42077, WO 02/056910 및 WO 05/017148, 및 문헌 [Holliger and Hudson, 상기 문헌]을 참조한다. 폴리펩티드, 예를 들어 본 발명의 나노바디의 Fc 부분에 대한 커플링은 또한 본 발명의 상응하는 폴리펩티드에 비해 증가된 반감기를 유도할 수 있다. 일부 용도를 위해, 임의의 생물학상 유의한 이펙터 기능을 보이지 않으면서 증가된 반감기를 부여하는 Fc 부분 및/또는 불변 도메인 (즉, C<sub>H</sub>2 및/또는 C<sub>H</sub>3 도메인)의 사용이 또한 적합하거나 또는 심지어 바람직할 수 있다. 생체내에서 증가된 반감기를 갖는 하나 이상의 이중과라토프성 폴리펩티드, 예컨대 나노바디 및 하나 이상의 불변 도메인을 포함하는 다른 적합한 구축물은 당업자에게 명백할 것이고, 예를 들어 임의로 링커 서열을 통해 C<sub>H</sub>3 도메인에 연결된 2개의 나노바디를 포함할 수 있다. 일반적으로, 증가된 반감기를 갖는 임의의 융합 단백질 또는 유도체는 바람직하게는 신장 흡수를 위한 컷오프 값인 50 kD를 초과하는 분자량을 가질 것이다.

[0266] 또 다른 하나의 구체적이지만 비제한적인 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드를 형성하기 위해, 본 발명의 하나 이상의 아미노산 서열은 이량체로 자가회합하는 경향이 감소된 (또는 본질적으로 없는) (즉, 종래의 4쇄 항체에서 자연적으로 발생하는 불변 도메인에 비해) 자연 발생, 합성 또는 반합성 불변 도메인 (또는 그의 유사체, 변이체, 돌연변이체, 일부 또는 단편)에 (임의로 적합한 링커 또는 힌지 영역을 통해) 연결될 수 있다. 이러한 단량체성 (즉, 자기-회합하지 않는) Fc쇄 변이체, 또는 그의 단편은 당업자에게 명백할 것이다. 예를 들어, 문헌 [Helm et al., J Biol Chem 1996 271 7494]에는 본 발명의 폴리펩티드쇄에 사용될 수 있는 단량체성 Fc쇄 변이체가 기재되어 있다.

[0267] 또한, 이러한 단량체성 Fc쇄 변이체는 바람직하게는 이들이 보체 또는 관련 Fc 수용체(들) (이들이 유래되는 Fc 부분에 따라)에 계속 결합할 수 있도록 하고/하거나, 이들이 유래되는 Fc 부분의 이펙터 기능의 일부 또는 전부를 (또는 의도되는 용도에 계속 적합한 감소된 수준으로) 계속 갖도록 하는 것이다. 대안적으로, 본 발명의 상기 폴리펩티드쇄에서, 단량체성 Fc쇄는 폴리펩티드쇄에 증가된 반감기를 부여하기 위해 사용될 수 있고, 이 경우에 단량체성 Fc쇄는 또한 이펙터 기능을 전혀 또는 본질적으로 갖지 않을 수 있다.

[0268] 추가의 펩티드 또는 폴리펩티드는 또한 (예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드를 발현하는 숙주 세포에 따라 본 발명의 폴리펩티드의 프리-, 프로- 또는 프리프로-형태를 제공하기 위해) 합성시에 숙주 세포로부터 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드의 분비를 지시하는 신호 서열 또는 리더 서열을 형성할 수 있다.

[0269] 추가의 펩티드 또는 폴리펩티드는 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드가 특정 기관, 조직, 세포, 또는 세포의 일부 또는 구획을 향해 유도되고/되거나 이를 투과하거나 그 내에 도입되도록 허용하고/하거나, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드가 생물학적 장벽, 예컨대 세포막, 세포층, 예컨대 상피 세포의 층, 고형 종양을 포함하는 종양, 또는 혈액-뇌-장벽을 투과하거나 가로지르도록 허용하는 서열 또는 신호를 형성할 수 있다. 이러한 아미노산 서열의 적합한 예는 당업자에게 명백할 것이고, 예를 들어 WO 08/020079의 118 페이지에 언급된 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부의 용도를 위해, 특히 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드가 그에 대해 지시되는 표적을 발현하는 세포를 사멸시키는 (예를 들어, 암의 치료에서), 또는 상기 세포의 성장 및/또는 증식을 감소시키거나 지연시키기 위한 용도를 위해, 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드는 또한 (세포)독성 단백질 또는 폴리펩티드에 연결될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 세포독성 폴리펩티드를 제공하기 위해 본 발명의 나노바디에 연결될 수 있는 상기 독성 단백질 및 폴리펩티드의 예는 당업자에게 명백할 것이고, 예를 들어 상기 인용된 선행 기술 및/또는 본원의 추가의 기재에서 찾아볼 수 있다. 한 예는 WO 03/055527에 기재된 소위 ADEPT™ 기술이다.

[0270] 하나의 선택적이지만 비제한적인 측면에 따르면, 상기 하나 이상의 추가의 펩티드 또는 폴리펩티드는 하나 이상의 링커 서열 (본원에 정의된 바와 같음)을 통해 임의로 연결될 수 있는 3개 이상, 예컨대 4 또는 5개 또는 그 초과를 포함하는 본 발명의 폴리펩티드를 제공하기 위해 하나 이상의 추가의 나노바디를 포함한다.

- [0271] 최종적으로, 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드가 2개 이상의 나노바디 및 하나 이상의 추가의 펩티드 또는 폴리펩티드 (본원에 언급된 바와 같음)를 포함할 수 있는 것도 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [0272] 2개 이상의  $V_{HH}$  도메인을 함유하는 다가 및 다중특이적 폴리펩티드 및 그의 제제에 대해서는, 또한 문헌 [Conrath et al., J. Biol. Chem., Vol. 276, 10. 7346-7350, 2001; Muyldermans, Reviews in Molecular Biotechnology 74 (2001), 277-302]; 뿐만 아니라 예를 들어 WO 96/34103 및 WO 99/23221을 참조한다. 본 발명의 일부의 특정 다중특이적 및/또는 다가 폴리펩티드의 일부의 다른 예는 본원에 언급되는 아블린크스 N.V.의 출원에서 볼 수 있다.
- [0273] 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드의 한 바람직한 예는 본 발명의 하나 이상의 이중과라토프성 나노바디 및 증가된 반감기를 제공하는 하나 이상의 나노바디를 포함한다. 상기 나노바디는 예를 들어 혈청 단백질, 특히 인간 혈청 알부민, 예컨대 인간 혈청 알부민, 티록신-결합 단백질, (인간) 트랜스페린, 피브리노겐, 이뮤노글로불린, 예컨대 IgG, IgE 또는 IgM에 대해 지시되는, 또는 WO 04/003019에 나열된 혈청 단백질 중 하나에 대해 지시되는 나노바디일 수 있다. 이들 중에서, 혈청 알부민 (특히 인간 혈청 알부민)에 또는 IgG (특히 인간 IgG, 예를 들어 문헌 [Muyldermans, 상기 문헌]에서 설명된 나노바디 VH-1 참조)에 결합할 수 있는 나노바디가 특히 바람직하다 (그렇지만, 예를 들어 마우스 또는 영장류에서의 실험을 위해, 각각 마우스 혈청 알부민 (MSA) 또는 상기 영장류로부터의 혈청 알부민에 대해 작용하거나 이와 교차-반응성인 나노바디가 사용될 수 있음). 그러나, 제약 용도를 위해서는, 인간 혈청 알부민 또는 인간 IgG에 대해 지시되는 나노바디가 통상적으로 바람직할 것이다. 증가된 반감기를 제공하고 본 발명의 폴리펩티드에 사용될 수 있는 나노바디는 WO 04/041865, WO 06/122787 및 아블린크스 N.V.의 추가의 특허 출원, 예컨대 상기 언급된 것에 기재된 혈청 알부민에 대해 지시되는 나노바디를 포함한다.
- [0274] 예를 들어, 본 발명에 사용하기 위한 증가된 반감기를 제공하는 일부의 바람직한 나노바디는 혈청 알부민의 FcRn에 대한 결합에 관여하지 않는 (인간) 혈청 알부민 상의 아미노산 잔기에 결합할 수 있는 나노바디 (예를 들어, WO 06/0122787 참조) 및/또는 혈청 알부민의 도메인 III의 일부를 형성하지 않는 혈청 알부민 상의 아미노산 잔기에 결합할 수 있는 나노바디 (예를 들어, WO 06/0122787 참조); 증가된 반감기를 갖거나 제공할 수 있는 나노바디 (예를 들어, 본원에 언급된 아블린크스 N.V.의 WO 08/028977 참조); 하나 이상의 종의 포유동물, 및 특히 하나 이상의 종의 영장류 (예컨대, 비제한적으로, 마카카 속으로부터의 원숭이 (예컨대, 및 특히, 시노물구스 원숭이 (마카카 파시콜라리스) 및/또는 레서스 원숭이 (마카카 몰라타)) 및 개코원숭이 (파피오 우르시누스))로부터의 혈청 알부민과 교차-반응성인, 인간 혈청 알부민에 대해 지시되는 나노바디 (아블린크스 N.V.의 WO 08/028977 참조); pH 비의존성 방식으로 혈청 알부민에 결합할 수 있는 나노바디 (예를 들어, 본원에 언급된 아블린크스 N.V.의 WO2008/043821 참조) 및/또는 조건 결합제인 나노바디 (예를 들어, 아블린크스 N.V.의 WO 08/043822 참조)를 포함한다.
- [0275] 증가된 반감기를 제공하고 본 발명의 폴리펩티드에서 사용될 수 있는 일부 특히 바람직한 나노바디는 WO 06/122787 (표 II 및 III 참조)에 개시된 나노바디 ALB-1 내지 ALB-10을 포함하고, 그 중 ALB-8 (WO 06/122787의 서열 62)이 특히 바람직하다.
- [0276] 본 발명의 구체적 측면에 따르면, 본 발명의 폴리펩티드는 2개 이상의 나노바디 이외에, 인간 혈청 알부민에 대해 지시되는 하나 이상의 나노바디를 함유한다.
- [0277] 또한, 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드에 부가되거나 부착되거나 융합될 수 있는 추가의 펩티드 또는 폴리펩티드는 프롤린, 알라닌 및 세린 (PAS 서열)로 이루어진 중합체를 포함한다. PAS 서열은 200-600개 잔기로 이루어지고, 유체역학적 부피의 극적인 증가를 유도하여 혈장 반감기를 연장할 수 있다. 또한, 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드의 혈청 반감기는 문헌 [Schellenbrger et al., (2009), Nature Biotechnology 27, No 12, p1186-1190]에 기재된 바와 같이 XTEN으로 불리는 864개 아미노산의 폴리펩티드에 대한 융합에 의해 연장될 수 있다.
- [0278] 일반적으로, 본 발명의 하나 이상의 이중과라토프성 나노바디를 함유하는 증가된 반감기를 갖는 본 발명의 임의의 폴리펩티드, 및 증가된 반감기를 갖는 본 발명의 이중과라토프성 나노바디의 또는 이러한 폴리펩티드의 임의의 유도체는 바람직하게는 본 발명의 상응하는 나노바디 자체의 반감기보다 1.5배 이상, 바람직하게는 2배 이상, 예컨대 5배 이상, 예를 들어 10배 이상 또는 20배 초과만큼 더 큰 반감기를 갖는다. 예를 들어, 증가된 반감기를 갖는 상기 유도체 또는 폴리펩티드는 본 발명의 상응하는 폴리펩티드 자체에 비해 1시간 초과, 바람직하게는 2시간 초과, 보다 바람직하게는 6시간 초과, 예컨대 12시간 초과, 또는 심지어 24, 48 또는 72시간 초과

로 증가된 혈청 반감기를 가질 수 있다.

- [0279] 본 발명의 바람직하지만 비제한적인 측면에서, 상기 유도체 또는 폴리펩티드는 인간에서 약 12시간 이상, 바람직하게는 24시간 이상, 보다 바람직하게는 48시간 이상, 훨씬 더 바람직하게는 72시간 이상 또는 그 초과인 혈청 반감기를 보일 수 있다. 예를 들어, 이러한 유도체 또는 폴리펩티드는 5일 이상 (예컨대, 약 5 내지 10일), 바람직하게는 9일 이상 (예컨대, 약 9 내지 14일), 보다 바람직하게는 약 10일 이상 (예컨대, 약 10 내지 15일), 또는 약 11일 이상 (예컨대, 약 11 내지 16일), 보다 바람직하게는 약 12일 이상 (예컨대, 약 12 내지 18일 또는 그 초과), 또는 14일 초과 (예컨대, 약 14 내지 19일)의 반감기를 가질 수 있다.
- [0280] 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드의 또 다른 바람직한, 그러나 비제한적 예는 본 발명의 하나 이상의 이중과라토프성 나노바디, 및 본 발명의 폴리펩티드를 특정 기관, 조직, 세포, 또는 세포의 일부 또는 구획을 향해 유도하고/하거나 본 발명의 폴리펩티드가 이를 투과하거나 그 내에 도입되도록 허용하고/하거나, 나노바디가 생물학적 장벽, 예컨대 세포막, 세포층, 예컨대 상피 세포의 층, 고형 종양을 포함하는 종양, 또는 혈액-뇌-장벽을 투과하거나 가로지르도록 허용하는 하나 이상의 나노바디를 포함한다. 이러한 나노바디 예는 목적하는 기관, 조직 또는 세포의 특정 세포-표면 단백질, 마커 또는 에피토프 (예를 들어, 종양 세포와 연관된 세포-표면 마커)에 대해 유도되는 나노바디, 및 WO 02/057445 및 WO 06/040153에 기재된 단일-도메인 뇌 표적화 항체 단편을 포함하고, 그 중 FC44 (WO 06/040153의 서열 189) 및 FC5 (WO 06/040154의 서열 190)가 바람직한 예이다.
- [0281] 본 발명의 폴리펩티드에서, 2개 이상의 나노바디 및 하나 이상의 폴리펩티드는 서로 직접 연결될 수 있고/있거나 (예를 들어, WO 99/23221에 기재된 바와 같이) 하나 이상의 적합한 스페이서 또는 링커, 또는 그의 임의의 조합을 통해 서로 연결될 수 있다.
- [0282] 본 발명의 한 측면에 따르면, 본 발명의 폴리펩티드는 본원에 정의된 바와 같이 본질적으로 단리된 형태로 존재한다.
- [0283] 본 발명의 아미노산 서열, 이중과라토프성 나노바디, 폴리펩티드 및 핵산은 본원의 추가의 설명으로부터 당업자에게 명백한 바와 같이 그 자체로 공지된 방식으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 및 폴리펩티드는 항체의 제조, 특히 항체 단편 ((단일) 도메인 항체 및 ScFv 단편을 포함하나 이에 제한되는 않음)의 제조를 위해 그 자체로 공지된 임의의 방식으로 제조될 수 있다. 아미노산 서열, 나노바디, 폴리펩티드 및 핵산을 제조하기 위한 일부의 바람직하지만 비제한적인 방법은 본원에 기재된 방법 및 기술을 포함한다.
- [0284] 당업자에게 명백한 바와 같이, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 및/또는 폴리펩티드의 제조에 특히 유용한 한 방법은 일반적으로 하기 단계를 포함한다:
- [0285] i) 본 발명의 상기 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 (또한 "본 발명의 핵산"으로서 본원에 언급됨)의 적합한 숙주 세포 또는 숙주 유기체 (또한 "본 발명의 숙주"로서 본원에 언급됨) 또는 또 다른 적합한 발현 시스템에서의 발현, 및 이어서 임의로
- [0286] ii) 이와 같이 얻은 본 발명의 상기 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드의 단리 및/또는 정제.
- [0287] 특히, 이러한 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:
- [0288] i) 본 발명의 상기 숙주가 본 발명의 하나 이상의 이중과라토프성 나노바디 및/또는 폴리펩티드를 발현 및/또는 생산하도록 하는 조건 하에 본 발명의 숙주의 배양 및/또는 유지, 및 이어서 임의로
- [0289] ii) 이와 같이 얻은 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드의 단리 및/또는 정제.
- [0290] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 (또는 그의 적합한 단편)을 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 이러한 핵산은 또한 본원에서 "본 발명의 핵산"으로서 언급될 것이고, 예를 들어 본원에 추가로 기재된 유전자 구축물의 형태로 존재할 수 있다.
- [0291] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 표 9 및 32의 특성의 개별 나노바디에 관한 서열 25 내지 43, 90 및 서열 213 내지 219에 제시된 아미노산 서열의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다. 대안적으로, 본 발명에 따른 핵산 분자는 서열 44 내지 69의 다가 및 이중과라토프성 나노바디 구축물을 코딩하는 핵산 분자를 포함한다. 추가로, 본 발명에 따른 핵산 분자는 표 18에서 확인된 나노바디에 관한 서열 192 내지 211에 관한 핵산 서열을 갖는 분자를 포함한다.
- [0292] 본 발명의 핵산은 단일 또는 이중 가닥 DNA 또는 RNA의 형태일 수 있고, 바람직하게는 이중 가닥 DNA의 형태이

다. 예를 들어, 본 발명의 뉴클레오티드 서열은 게놈 DNA, cDNA 또는 합성 DNA (예컨대, 의도되는 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서의 발현을 위해 특이적으로 조정된 코돈 용법을 갖는 DNA)일 수 있다.

- [0293] 본 발명의 한 측면에 따르면, 본 발명의 핵산은 본원에 정의된 바와 같이 본질적으로 단리된 형태로 존재한다.
- [0294] 본 발명의 핵산은 또한 다시 본질적으로 단리된 형태로 존재할 수 있는 벡터, 예컨대 예를 들어 플라스미드, 코스미드 또는 YAC의 형태로 존재하고/하거나, 그 내에 존재하고/하거나, 그의 일부일 수 있다.
- [0295] 본 발명의 핵산은 본원에 제시된 본 발명의 폴리펩티드에 대한 아미노산 서열에 대한 정보를 기초로 하여 그 자체로 공지된 방식으로 제조되거나 얻을 수 있고/있거나 적합한 천연 공급원으로부터 단리될 수 있다. 유사체를 제공하기 위해, 자연 발생  $V_{H}$  도메인을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 예를 들어 상기 유사체를 코딩하는 본 발명의 핵산을 제공하기 위해 부위 지정 돌연변이유발에 적용될 수 있다. 또한, 당업자에게 명백한 바와 같이, 본 발명의 핵산을 제조하기 위해, 또한 몇몇의 뉴클레오티드 서열, 예컨대 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열 및 예를 들어 하나 이상의 링커를 코딩하는 핵산은 적합한 방식으로 함께 연결될 수 있다.
- [0296] 본 발명의 핵산을 생성하는 기술은 당업자에게 명백할 것이고, 예를 들어 자동 DNA 합성; 부위-지정 돌연변이유발; 2개 이상의 자연 발생 및/또는 합성 서열 (또는 그의 2개 이상의 일부)의 조합, 말단절단된 발현 생성물의 발현을 유도하는 돌연변이의 도입; 하나 이상의 제한 부위의 도입 (예를 들어, 적합한 제한 효소를 사용하여 용이하게 소화시키고/시키거나 라이게이션시킬 수 있는 카세트 및/또는 영역의 생성을 위한), 및/또는 예를 들어 주형으로서 CXCR2의 자연 발생 형태의 서열을 사용하고 하나 이상의 "미스매치된" 프라이머를 이용하는 PCR 반응에 의한 돌연변이의 도입을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 이들 및 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이고, 다시 표준 안내서, 예컨대 상기 언급된 문헌 [Sambrook et al., 및 Ausubel et al.] 뿐만 아니라 하기 실시예를 참조한다.
- [0297] 본 발명의 핵산은 또한 유전자 구축물의 형태로 존재하고/하거나 그 내에 존재하고/하거나 그의 일부일 수 있다. 이러한 유전자 구축물은 일반적으로 그 자체로 공지된 유전자 구축물의 하나 이상의 요소, 예컨대 예를 들어 하나 이상의 적합한 조절 요소 (예컨대, 적합한 프로모터(들), 인핸서(들), 종결인자(들) 등) 및 본원에 언급되는 유전자 구축물의 추가의 요소에 임의로 연결된 본 발명의 하나 이상의 핵산을 포함한다. 본 발명의 하나 이상의 핵산을 포함하는 상기 유전자 구축물은 또한 "본 발명의 유전자 구축물"로서 본원에 언급될 것이다.
- [0298] 본 발명의 유전자 구축물은 DNA 또는 RNA일 수 있고, 바람직하게는 이중-가닥 DNA이다. 예를 들어, 본 발명의 유전자 구축물은 또한 의도되는 숙주 세포 또는 숙주 유기체의 형질전환에 적합한 형태, 의도되는 숙주 세포의 게놈 DNA 내로의 통합에 적합한 형태 또는 의도되는 숙주 유기체에서 비의존성 복제, 유지 및/또는 유전에 적합한 형태로 존재할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 유전자 구축물은 벡터, 예컨대 예를 들어 플라스미드, 코스미드, YAC, 바이러스 벡터 또는 트랜스포손의 형태로 존재할 수 있다. 특히, 벡터는 발현 벡터, 즉 발현 시험관내 및/또는 생체내에서 (예를 들어, 적합한 숙주 세포, 숙주 유기체 및/또는 발현 시스템에서) 발현을 제공할 수 있는 벡터일 수 있다.
- [0299] 바람직하지만 비제한적인 측면에서, 본 발명의 유전자 구축물은
- [0300] i) 본 발명의 하나 이상의 핵산; 이에 작동가능하게 연결된
- [0301] ii) 하나 이상 조절 요소, 예컨대 프로모터, 및 임의로 적합한 종결인자;
- [0302] 및 임의로 또한
- [0303] iii) 그 자체로 공지된 유전자 구축물의 하나 이상의 추가의 요소
- [0304] 를 포함하고;
- [0305] 여기서, "작동가능하게 접촉된" 및 "작동가능하게 연결된"은 WO 08/020079의 131-134 페이지에 제시된 의미를 갖고; "조절 요소", "프로모터", "종결인자" 및 "추가의 요소"는 WO 08/020079의 131-134 페이지에 기재되어 있고; 유전자 구축물은 WO 08/020079의 131-134 페이지에 추가로 기재될 수 있다.
- [0306] 본 발명의 핵산 및/또는 본 발명의 유전자 구축물은 숙주 세포 또는 숙주 유기체를 형질전환시키기 위해, 즉 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드의 발현 및/또는 생산을 위해 사용될 수 있다. 적합한 숙주 또는 숙주 세포는 당업자에게 명백할 것이고, 예를 들어 임의의 적합한 진균, 원핵 또는 진핵 세포 또는 세포주

또는 임의의 적합한 진균, 원핵 또는 진핵 유기체, 예를 들어 WO 08/020079의 134 및 135 페이지에 기재된 것; 뿐만 아니라 당업자에게 명백할, 항체 및 항체 단편 ((단일) 도메인 항체 및 ScFv 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않음)의 발현 및 생산을 위해 그 자체로 공지된 모든 다른 숙주 또는 숙주 세포일 수 있다. 또한, 상기 인용된 일반적인 배경 기술, 및 예를 들어 WO 94/29457; WO 96/34103; WO 99/42077; 문헌 [Frenken et al., (1998), 상기 문헌; Riechmann and Muyldermans, (1999), 상기 문헌; van der Linden, (2000), 상기 문헌; Thomassen et al., (2002), 상기 문헌; Joosten et al., (2003), 상기 문헌; Joosten et al., (2005), 상기 문헌]; 및 본원에 언급된 추가의 참고문헌을 참조한다.

- [0307] 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 및 폴리펩티드는 또한 예를 들어 WO 08/020079의 135 및 136 페이지 및 WO 08/020079에 인용된 추가의 참고문헌에 추가로 기재된 바와 같은 예방 및/또는 치료 목적을 위해 (예를 들어, 유전자 요법으로서) 다세포 유기체의 하나 이상의 세포, 조직 또는 기관으로 도입되어 발현될 수 있다.
- [0308] 세포에서 나노바디의 발현을 위해, 이들은 또한 예를 들어 WO 94/02610, WO 95/22618 및 US-A-7004940; WO 03/014960; 문헌 [Cattaneo, A. & Biocca, S. (1997) Intracellular Antibodies: Development and Applications. Landes and Springer-Verlag; 및 Kontermann, Methods 34, (2004), 163-170]에 기재된 바와 같이 소위 "인트라바디"로서 발현될 수 있다.
- [0309] 또한, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 및 폴리펩티드는 예를 들어 트랜스제닉 포유동물의 유액에서, 예를 들어 토끼, 소, 염소 또는 양의 유액에서 (예를 들어, 포유동물 내로 트랜스젠의 도입을 위한 일반적 기술에 대해 US-A-6,741,957, US-A-6,304,489 및 US-A-6,849,992 참조), 식물 또는 잎, 꽃, 열매, 종자, 뿌리 또는 괴경을 포함하나 이에 제한되지는 않는 식물의 일부에서 (예를 들어, 감자, 옥수수, 대두 또는 알팔파에서) 또는 예를 들어 누에 봄뱀 모리(*Bombix mori*)의 번데기에서 생산될 수 있다.
- [0310] 추가로, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 및 폴리펩티드는 또한 세포-무함유 발현 시스템에서 발현 및/또는 생산될 수 있고, 이러한 시스템의 적합한 예는 당업자에게 명백할 것이다. 일부의 바람직한, 그러나 비제한적 예는 밀 배아 시스템; 토끼 망상적혈구 용해물; 또는 이. 콜라이(*E. coli*) 주베이(Zubay) 시스템에서의 발현을 포함한다.
- [0311] 상기 언급된 바와 같이, 이중과라토프성 폴리펩티드 및 나노바디의 사용의 이점 중 하나는 그를 기초로 한 폴리펩티드가 적합한 박테리아 시스템에서의 발현을 통해 제조될 수 있다는 것이고, 적합한 박테리아 발현 시스템, 벡터, 숙주 세포, 조절 요소 등은 예를 들어 상기 언급된 참고문헌으로부터 당업자에게 명백할 것이다. 그러나, 본 발명은 그의 가장 넓은 의미에서 박테리아 시스템에서의 발현으로 제한되지 않음을 유의하여야 한다.
- [0312] 바람직하게는, 본 발명에서, 본 발명의 폴리펩티드를 제약 용도에 적합한 형태로 제공하는 (생체내 또는 시험관내) 발현 시스템, 예컨대 박테리아 발현 시스템이 사용되고, 그러한 발현 시스템은 다시 당업자에게 명백할 것이다. 또한, 당업자에게 명백할 것이기 때문에, 제약 용도에 적합한 본 발명의 폴리펩티드는 펩티드 합성을 위한 기술을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0313] 산업적 규모의 생산을 위해, 이중과라토프성 나노바디 또는 나노바디-함유 단백질 치료제의 (산업적) 생산을 위한 바람직한 이중 숙주는 대규모 발현/생산/발효에, 특히 대규모 제약 (즉, GMP 등급) 발현/생산/발효에 적합한 이. 콜라이, 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 에스. 세레비지아에(*S. cerevisiae*)의 균주를 포함한다. 이러한 균주의 적합한 예는 당업자에게 명백할 것이다. 이러한 균주 및 생산/발현 시스템은 또한 회사, 예컨대 바이오비트룸(Biovitrum, 스웨덴 옘살라))으로부터 이용가능하다.
- [0314] 대안적으로, 포유동물 세포주, 특히 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포가 대규모 발현/생산/발효, 특히 대규모 제약 발현/생산/발효를 위해 사용될 수 있다. 다시, 이러한 발현/생산 시스템은 또한 상기 언급된 일부의 회사로부터 이용가능하다.
- [0315] 특정 발현 시스템의 선택은 부분적으로는 특정 번역후 변형, 보다 구체적으로 글리코실화의 필요성에 따라 결정될 것이다. 그에 대한 글리코실화가 바람직하거나 또는 목적하는 나노바디-함유 제조합 단백질의 생산은 발현된 단백질을 글리코실화하는 능력을 갖는 포유동물 발현 숙주의 사용을 필요로 할 것이다. 이와 관련하여, 얻어지는 글리코실화 패턴 (즉, 부착되는 잔기의 유형, 수 및 위치)은 발현에 사용되는 세포 또는 세포주에 따라 결정될 것임이 당업자에게 명백할 것이다. 바람직하게는, 인간 세포 또는 세포주가 사용되거나 (즉, 본질적으로 인간 글리코실화 패턴을 갖는 단백질을 생성) 또는 인간 글리코실화와 본질적으로 및/또는 기능적으로 동일하거나 또는 적어도 인간 글리코실화를 모방하는 글리코실화 패턴을 제공할 수 있는 또 다른 포유동물 세포주가

사용된다. 일반적으로, 원핵 숙주, 예컨대 이. 콜라이는 단백질을 글리코실화하는 능력을 갖지 않고, 하등 진핵생물, 예컨대 효모는 통상적으로 인간 글리코실화와 상이한 글리코실화 패턴을 생성한다. 그럼에도 불구하고, 모든 상기 숙주 세포 및 발현 시스템이 얻어지는 목적하는 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드에 따라 본 발명에 사용될 수 있음을 이해하여야 한다.

- [0316] 따라서, 본 발명의 한 측면에 따르면, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드는 글리코실화된다. 본 발명의 또 다른 비제한적 측면에 따르면, 본 발명의 아미노산 서열, 나노바디 또는 폴리펩티드는 비-글리코실화된다.
- [0317] 본 발명의 바람직하지만 비제한적인 한 측면에 따르면, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드는 박테리아 세포, 특히 대규모 제약 생산에 적합한 박테리아 세포, 예컨대 상기 언급한 균주의 세포에서 생산된다.
- [0318] 본 발명의 또 다른 바람직하지만 비제한적인 측면에 따르면, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드는 효모 세포, 특히 대규모 제약 생산에 적합한 효모 세포, 예컨대 상기 언급된 종의 세포에서 생산된다.
- [0319] 본 발명의 또 다른 바람직하지만 비제한적인 측면에 따르면, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드는 포유동물 세포, 특히 인간 세포 또는 인간 세포주의 세포, 보다 특히 대규모 제약 생산에 적합한 인간 세포 또는 인간 세포주의 세포, 예컨대 상기 본원에 언급된 세포주에서 생산된다.
- [0320] WO 08/020079의 138 및 139 페이지에 추가로 기재된 바와 같이, 숙주 세포에서의 발현이 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 및 폴리펩티드를 생산하기 위해 사용될 때, 이들은 세포 내에서 (예를 들어, 시토졸, 주변세포질 또는 봉입체에서) 생산된 후 숙주 세포로부터 단리되고 임의로 추가로 정제되거나; 또는 세포 외에서 (예를 들어, 숙주 세포가 배양되는 배지에서) 생산된 후 배양 배지로부터 단리되고 임의로 추가로 정제될 수 있다. 따라서, 본 발명의 하나의 비제한적 측면에 따르면, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드는 세포 내에서 생산되고 숙주 세포, 특히 박테리아 세포 또는 박테리아 세포 내의 봉입체로부터 단리된 아미노산 서열, 나노바디 또는 폴리펩티드이다. 본 발명의 또 다른 비제한적 측면에 따르면, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드는 세포 외에서 생산되고 숙주 세포가 배양되는 배지로부터 단리된 나노바디 또는 폴리펩티드이다.
- [0321] 이들 숙주 세포와 사용하기 바람직하지만 비제한적인 일부 프로모터는 WO 08/020079의 139 및 140 페이지에 언급된 것을 포함한다.
- [0322] 이들 숙주 세포와 사용하기 바람직하지만 비제한적인 일부 분비 서열은 WO 08/020079의 140 페이지에 언급된 것을 포함한다.
- [0323] 본 발명의 숙주 또는 숙주 세포를 형질전환시키기 위해 적합한 기술은 당업자에게 명백할 것이고, 의도되는 숙주 세포/숙주 유기체 및 사용되는 유전자 구축물에 따라 결정될 수 있다. 다시 상기 언급한 안내서 및 특허 출원을 참조한다.
- [0324] 형질전환 후에, 본 발명의 뉴클레오티드 서열/유전자 구축물로 성공적으로 형질전환된 숙주 세포 또는 숙주 유기체를 검출하고 선택하는 단계를 수행할 수 있다. 이는 예를 들어 본 발명의 유전자 구축물에 존재하는 선택 마커를 기초로 한 선택 단계 또는 예를 들어 특이적 항체를 사용한 본 발명의 폴리펩티드의 검출을 수반하는 단계일 수 있다.
- [0325] 형질전환된 숙주 세포 (안정한 세포주의 형태로 존재할 수 있는) 또는 숙주 유기체 (안정한 돌연변이체주 또는 균주의 형태로 존재할 수 있는)는 본 발명의 추가 측면을 형성한다.
- [0326] 바람직하게는, 이들 숙주 세포 또는 숙주 유기체는 이들이 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드를 (예를 들어, 적합한 조건 하에) (및 숙주 유기체의 경우에: 그의 하나 이상의 세포, 일부, 조직 또는 기관에서) 발현하거나 (적어도) 발현할 수 있도록 하는 것이다. 본 발명은 또한 예를 들어 세포 분열 또는 유성 또는 무성 생식에 의해 얻어질 수 있는 본 발명의 숙주 세포 또는 숙주 유기체의 추가의 세대, 자손체 및/또는 자손을 추가로 포함한다.
- [0327] 본 발명의 아미노산 서열의 발현체를 생산하거나 얻기 위해, 형질전환된 숙주 세포 또는 형질전환된 숙주 유기체는 일반적으로 본 발명의 (목적하는) 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드가 발현/생산되도록 하는 조건 하에 존재, 유지 및/또는 배양될 수 있다. 적합한 조건은 당업자에게 명백할 것이고, 통상적으로 사용되는 숙주 세포/숙주 유기체 뿐만 아니라 본 발명의 (관련) 뉴클레오티드 서열의 발현을 제어하는 조절 요소에 따라 결

정될 것이다. 다시, 상기 본 발명의 유전자 구축물에 대한 단락에서 언급된 안내서 및 특허 출원을 참조한다.

- [0328] 일반적으로, 적합한 조건은 적합한 배지의 사용, 식품 및/또는 적합한 영양소의 적합한 공급원의 존재, 적합한 온도의 사용, 및 임의로 적합한 유도 인자 또는 화합물의 존재 (예를 들어, 본 발명의 뉴클레오티드 서열이 유도성 프로모터의 제어 하에 존재할 경우)를 포함할 수 있고; 이들은 모두 당업자에 의해 선택될 수 있다. 다시, 이러한 조건 하에, 본 발명의 폴리펩티드는 구성적 방식으로, 일시 방식으로, 또는 적합하게 유도된 경우에만 발현될 수 있다.
- [0329] 또한, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드는 (먼저) 미성숙 형태 (상기 언급된 바와 같음)로 생성되고, 이어서 사용되는 숙주 세포/숙주 유기체에 따라 번역후 변형에 적용될 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다. 또한, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드는 다시 사용되는 숙주 세포/숙주 유기체에 따라 글리코실화될 수 있다.
- [0330] 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드는 그 자체로 공지된 단백질 단리 및/또는 정제 기술, 예컨대 (정제용) 크로마토그래피 및/또는 전기영동 기술, 차등 침전 기술, 친화도 기술 (예를 들어, 본 발명의 아미노산 서열, 나노바디 또는 폴리펩티드와 융합된 절단가능한 특정 아미노산 서열을 이용) 및/또는 정제용 면역학적 기술 (즉, 단리되는 아미노산 서열에 대한 항체를 이용)을 이용하여 숙주 세포/숙주 유기체 및/또는 상기 숙주 세포 또는 숙주 유기체가 배양된 배지로부터 단리될 수 있다.
- [0331] 일반적으로, 제약 용도를 위해, 본 발명의 폴리펩티드는 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드 및 하나 이상의 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제 및/또는 아주반트, 및 임의로 하나 이상의 추가의 제약 활성 폴리펩티드 및/또는 화합물을 포함하는 제약 제제 또는 조성물로서 제제화될 수 있다. 비제한적 예로서, 상기 제제는 경구 투여, 비경구 투여 (예컨대, 정맥내, 근육내 또는 피하 주사 또는 정맥내 주입에 의한), 국소 투여, 흡입에 의한 투여 (예를 들어, 네블라이저, 계량 용량 흡입기 (MDI) 또는 건조 분말 흡입기 (DPI)를 통한 또는 비내 경로를 통한), 피부 패치, 이식물, 좌제, 설하 경로 등에 의한 투여에 적합한 형태로 존재할 수 있다. 이러한 적합한 투여 형태 (투여 방식에 따라 고체, 반-고체 또는 액체일 수 있는) 및 그의 제조에 사용하기 위한 방법 및 담체는 당업자에게 명백할 것이고, 본원에서 추가로 설명된다.
- [0332] 따라서, 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 이중과라토프성 폴리펩티드, 바람직하게는 하나 이상의 이중과라토프성 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인, 보다 바람직하게는 본 발명에 따른 하나 이상의 이중과라토프성 나노바디, 및 하나 이상의 적합한 담체, 희석제 또는 부형제 (즉, 적합한 제약 용도를 위해), 및 임의로 하나 이상의 추가의 활성 물질을 함유하는 제약 조성물에 관한 것이다.
- [0333] 일반적으로, 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드는 그 자체로 공지된 임의의 적합한 방식으로 제제화되고 투여될 수 있고, 그에 대해서는 상기 언급된 일반적인 배경 기술 (및 특히 WO 04/041862, WO 04/041863, WO 04/041865, WO 04/041867 및 WO 08/020079) 뿐만 아니라 표준 안내서, 예컨대 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Ed., Mack Publishing Company, USA (1990), Remington, the Science and Practice of Pharmacy, 21th Edition, Lippincott Williams and Wilkins (2005); 또는 Handbook of Therapeutic Antibodies (S. Dubel, Ed.), Wiley, Weinheim, 2007] (예를 들어, 252-255 페이지 참조)을 참조한다.
- [0334] 예를 들어, 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드는 통상적인 항체 및 항체 단편 (ScFv 및 디아바디 포함) 및 다른 제약 활성 단백질에 대해 그 자체로 공지된 임의의 방식으로 제제화되고 투여될 수 있다. 이러한 제제 및 그의 제조 방법은 당업자에게 명백할 것이고, 예를 들어 비경구 투여 (예를 들어, 정맥내, 복강내, 피하, 근육내, 체강내, 동맥내 또는 척수강내 투여) 또는 국소 (즉, 경피 또는 피내) 투여에 적합한 제제를 포함한다.
- [0335] 비경구 투여용 제제는 예를 들어 주입 또는 주사에 적합한 멸균 용액, 현탁액, 분산액 또는 에멀전일 수 있다. 이러한 제제에 적합한 담체 또는 희석제는 예를 들어 WO 08/020079의 143 페이지에서 언급된 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 통상적으로, 수용액 또는 현탁액이 바람직할 것이다.
- [0336] 이중과라토프성 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 및 나노바디를 포함하는 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드는 또한 유전자 요법 전달 방법을 사용하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 그 전부가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 5,399,346을 참조한다. 유전자 요법 전달 방법을 이용하여, 본 발명의 이중과라토프성 또는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자로 형질감염된 일차 세포를 특정 기관, 조직, 이식편, 종양 또는 세포를 표적화하기 위해 조직 특이적 프로모터로 추가로 형질감염시키고, 세포 소기관에 편재된 발현을 위한 신호 및 안정화 서열

로 추가로 형질감염시킬 수 있다.

- [0337] 따라서, 본 발명의 이중과라토프성 및 폴리펩티드, 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 및 나노바디는 제약상 허용되는 비히클, 예컨대 불활성 희석제 또는 동화성 식용 담체와 조합되어 전신, 예를 들어 경구 투여될 수 있다. 이는 경질 또는 연질 젤 젤라틴 캡슐 내에 봉입될 수 있거나, 정제로 압축될 수 있거나, 또는 환자 식이의 식품과 직접 혼입될 수 있다. 경구 치료 투여를 위해, 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드는 하나 이상의 부형제와 조합되고, 섭취가능한 정제, 협착 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 현탁액, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 이러한 조성물 및 제제는 0.1% 이상의 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드, 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 또는 나노바디를 함유하여야 한다. 조성물 및 제제 내의 그의 백분율은 물론 변할 수 있고, 편리하게는 제시된 단위 투여 형태의 중량의 약 2 내지 약 60%일 수 있다. 상기 치료상 유용한 조성물 내의 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드는 유효 투여량 수준이 얻어지도록 하는 것이다.
- [0338] 정제, 트로키, 환제, 캡슐 등은 또한 결합제, 부형제, 붕해제, 윤활제 및 감미제 또는 향미제, 예를 들어 WO 08/020079의 143-144 페이지에 언급된 것을 함유할 수 있다. 단위 투여 형태가 캡슐인 경우에, 이는 상기 유형의 물질 이외에도, 액체 담체, 예컨대 식물성 오일 또는 폴리에틸렌 글리콜을 함유할 수 있다. 여러 다른 물질이 코팅으로서 존재하거나, 또는 달리 고체 단위 투여 형태의 물리적 형태를 변형시키기 위해 존재할 수 있다. 예를 들어, 정제, 환제 또는 캡슐은 젤라틴, 왁스, 셀락 또는 당 등으로 코팅될 수 있다. 시럽 또는 엘릭시르는 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 및 폴리펩티드, 감미제로서 수크로스 또는 프룩토스, 보존제로서 메틸 및 프로필파라벤, 염료 및 향미제, 예컨대 체리 또는 오렌지 향미제를 함유할 수 있다. 물론, 임의의 단위 투여 형태를 제조하는데 사용되는 임의의 물질은 제약상 허용되어야 하며 사용되는 양에서 실질적으로 비-독성이어야 한다. 또한, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디, 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 및 폴리펩티드는 지속-방출 제제 및 장치 내에 혼입될 수 있다.
- [0339] 경구 투여용 제제 및 제형에는 또한 본 발명의 구축물이 위 환경을 건디고 장으로 통과할 수 있도록 하는 장용 코팅이 제공될 수 있다. 보다 일반적으로, 경구 투여용 제제 및 제형은 위장관의 임의의 바람직한 부분 내로의 전달을 위해 적합하게 제제화될 수 있다. 또한, 적합한 좌제가 위장관 내로 전달을 위해 사용될 수 있다.
- [0340] 본 발명의 이중과라토프성 나노바디, 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 및 폴리펩티드는 또한 WO 08/020079의 144 및 145 페이지 상에 추가로 기재된 바와 같이 주입 또는 주사에 의해 정맥내로 또는 복강내로 투여될 수 있다.
- [0341] 국소 투여를 위해, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디, 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 및 폴리펩티드는 순수한 형태로, 즉, 액체일 때 적용될 수 있다. 그러나, WO 08/020079의 145 페이지에 추가로 기재된 바와 같이 고체 또는 액체일 수 있는 피부에 허용되는 담체와 조합되어 조성물 또는 제제로서 피부에 투여하는 것이 일반적으로 바람직하다.
- [0342] 일반적으로, 액체 조성물, 예컨대 로션 내의 본 발명의 이중과라토프성 나노바디, 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 및 폴리펩티드의 농도는 약 0.1-25 wt-%, 바람직하게는 약 0.5-10 wt-%일 것이다. 젤 또는 분말과 같은 반고체 또는 고체 조성물 내의 농도는 약 0.1-5 wt-%, 바람직하게는 약 0.5-2.5 wt-%일 것이다.
- [0343] 치료에 사용하기 위해 필요한 본 발명의 이중과라토프성 나노바디, 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 및 폴리펩티드의 양은 선택된 특정 이중과라토프성 나노바디 또는 폴리펩티드 뿐만 아니라 투여 경로, 치료되는 상태의 특성 및 환자의 연령 및 상태에 따라 상이할 것이고, 최종적으로 담당의 또는 임상주의 판단에 따라 결정될 것이다. 또한, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 및 폴리펩티드의 투여량은 표적 세포, 종양, 조직, 이식편, 또는 기관에 따라 상이하다.
- [0344] 목적하는 용량은 편리하게는 단일 용량으로 또는 적절한 간격으로 투여되는 분할 용량, 예를 들어 1일에 2, 3, 4회 또는 그 초과 하위용량으로 제공될 수 있다. 하위용량 자체는, 예를 들어 다수의 느슨한 간격의 분리된 투여로 추가로 분할될 수 있으며; 예컨대 취입기로부터 다중 흡입되거나, 또는 다수의 점적을 안구로 적용할 수 있다.
- [0345] 투여 요법은 장기간, 1일 치료를 포함할 수 있다. "장기간"은 적어도 2주, 바람직하게는, 수 주, 수 개월, 또는 수 년의 기간을 의미한다. 상기 투여량 범위 내의 필요한 변형은 본원의 교시를 고려하여 단지 통상적인 실험을 사용하여 당업자가 결정할 수 있다. 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA]을 참조한다. 투여량은 또한 임의의 합병증 사건에서 개별 임상주의에 의해 조정될 수 있다.

- [0346] 본 발명의 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 유효량의 폴리펩티드 또는 제약 조성물, 바람직하게는 본 발명에 따른 이중과라토프성 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 또는 나노바디 또는 이를 함유하는 조성물을 투여함으로써 CXCR2 신호 전달의 이상 기능을 수반하는 질환 또는 상태를 치료하는 방법에 관한 것이다. 본원에 논의된 바와 같이, CXCR2 신호 전달은 폐 유조직의 파괴를 야기하는 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD)으로 고통받는 환자의 폐에서 염증 반응을 매개한다. COPD로 고통받는 환자의 폐에서 증가된 수로 관찰되는 백혈구의 이동은 IL-8, Gro- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , EMA 78 및 GCP-2를 포함하는 몇몇 리간드에 결합하는 그 세포의 표면 상의 CXCR2에 의해 매개된다. 폐 내의 호중구 수의 증가는 질환의 중증도와 연관성이 있다. 추가로, Gro- $\alpha$  농도는 COPD 환자의 유도된 객담 및 기관지 세척액 (BAL) 유체에서 현저하게 증가한다. 따라서, CXCR2 길항작용은 이러한 질환의 고통스러운 증상을 예방, 치료 또는 완화할 것으로 예상된다.
- [0347] 따라서, 본 발명은 이중과라토프성 폴리펩티드, 예컨대 본 발명의 이중과라토프성 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 또는 나노바디 및 특히 그의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, COPD 또는 COPD 악화의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 COPD 또는 COPD 악화의 치료를 위한, 이중과라토프성 나노바디 및 이를 함유하는 조성물을 포함하는 상기 이중과라토프성 폴리펩티드의 용도에 관한 것이다.
- [0348] 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드, 특히 이중과라토프성 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 또는 나노바디 및 그의 조성물이 또한 CXCR2 신호 전달의 이상 기능이 수반되는 다른 질환, 예를 들어 기도의 다른 상태, 예컨대 만성 섬유증, 중증 천식, 천식의 악화, 알레르기성 천식, 급성 폐 손상, 급성 호흡 곤란 증후군, 특발성 폐 섬유증, 기도 개형, 폐쇄성 세기관지염 증후군 또는 기관지폐 이형성증의 치료에 유용함은 숙련된 독자에게 용이하게 명백할 것이다.
- [0349] 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드, 예를 들어 이중과라토프성 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 또는 나노바디 및 그의 제약 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 추가의 질환 및 상태는 아테롬성동맥경화증, 사구체신염, 염증성 장 질환 (크론병), 혈관신생, 및 황반 변성, 당뇨병성 망막병증 및 당뇨병성 신경병증을 포함하는 새로운 혈관 발생을 특징으로 하는 질환, 다발성 경화증, 건선, 연령-관련 황반 변성 질환, 안구 베체트병, 포도막염, 특발성 폐동맥 고혈압 (PAH), 가족성 PAH 및 관련 PAH를 포함하는 PAH, 만성 염증성 질환, 류마티스 관절염, 골관절염, 비소세포 암종, 결장암, 췌장암, 식도암, 난소암, 유방암, 고형 종양 및 전이, 흑색종, 간세포성 암종 또는 허혈 재관류 손상이다.
- [0350] 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드, 예를 들어 이중과라토프성 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 또는 나노바디 및 그의 제약 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 추가의 질환 및 상태는 겸상 적혈구 질환에서 용혈성 수혈 유도 혈관 폐쇄 위기, 허혈/재관류 손상, 급성 졸중/심근 경색, 폐쇄성 두부 손상, 외상후 염증 및 인슐린 내성 당뇨병이다.
- [0351] 상기 방법을 위해, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디, 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 및/또는 폴리펩티드 및/또는 그를 포함하는 조성물은 사용되는 특정 제약 제제 또는 조성물에 따라 임의의 적합한 방식으로 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 이중과라토프성 나노바디 및 /또는 폴리펩티드 및/또는 그를 포함하는 조성물은 예를 들어 다시 사용되는 특정 제약 제제 또는 조성물에 따라 경구로, 복강내로 (예를 들어, 정맥내로, 피하로, 근육내로, 또는 위장관을 우회하는 임의의 다른 투여 경로를 통해), 비강내로, 경피로, 국소로, 좌체에 의해, 흡입에 의해 투여될 수 있다. 일반적으로 COPD에 대해, 흡입은 바람직한 경로가 아니다. 임상되는 개별 환자의 필요에 따라 적합한 투여 경로 및 상기 투여에 사용되는 적합한 제약 제제 또는 조성물을 선택할 수 있을 것이다.
- [0352] 본 발명의 이중과라토프성 나노바디, 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 및/또는 폴리펩티드 및/또는 그를 포함하는 조성물은 예방 또는 치료되는 질환 또는 장애의 예방 및/또는 치료에 적합한 치료 요법에 따라 투여된다. 임상되는 일반적으로 예방 또는 치료할 질환 또는 장애, 치료할 질환의 중증도 및/또는 그의 증상의 중증도, 사용되는 본 발명의 특정 이중과라토프성 나노바디, 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드, 사용되는 특정 투여 경로 및 제약 제제 또는 조성물, 환자의 연령, 성별, 체중, 식이, 전반적 상태, 및 임상자에게 잘 공지된 유사한 요인과 같은 요인에 따라 적합한 치료 요법을 결정할 수 있을 것이다.
- [0353] 일반적으로, 본원에 언급된 질환 및 장애, 특히 COPD의 예방 및/또는 치료를 위해, 투여되는 양은 본 발명의 특정 이중과라토프성 나노바디, 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드의 효력, 특정 투여 경로 및 사용되는 특정 제약 제제 또는 조성물에 따라 결정될 것이다. 일반적으로, 1 그램 내지 0.01 마이크로그램/kg(체중)/일, 바람직하게는 0.1 그램 내지 0.1 마이크로그램/kg(체중)/일, 예컨대 약 1, 10, 100 또는 1000 마이크로그램/kg(체중)/일의 양으로, 연속적으로 (예를 들어, 주입에 의해), 단일 1일 용량으로서 또는 하루 동안 다수

의 분할 용량으로서 투여될 것이다. 임상的是 일반적으로 본원에 언급된 인자에 따라 적합한 1일 용량을 결정할 수 있을 것이다. 또한, 특정 경우에 임상的是 예를 들어 상기 언급된 인자 및 그의 전문가적인 판단을 기초로 하여 상기 양으로부터 변경된 양을 선택할 수 있음은 명백할 것이다.

[0354] 본 발명의 이중과라토프성 나노바디, 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 및 폴리펩티드는 또한 하나 이상의 추가의 제약 활성 화합물 또는 성분과 조합되어, 즉 상승 효과를 유도하거나 유도하지 않을 수 있는 조합 치료 요법으로서 사용될 수 있다. 다시, 임상的是 예를 들어 상기 언급된 인자 및 그의 전문가적인 판단을 기초로 하여 상기 추가의 화합물 또는 성분 뿐만 아니라 적합한 조합 치료 요법을 선택할 수 있을 것이다.

[0355] 예를 들어, 본 발명의 이중과라토프성 폴리펩티드, 예컨대 이중과라토프성 나노바디를 COPD에 대한 통상의 치료법, 예컨대 단기 및 장기 지속성 β-아드레날린성 기관지확장제, 흡입용 항콜린제 (무스카린성 길항제) 및 흡입용 코티코스테로이드와 조합하는 것이 가능할 것이다.

[0356] 본 발명에 따라 사용되는 치료 요법의 효과는 임상的是에게 명백한 바와 같이 관련 질환 또는 장애에 대해 그 자체로 공지된 임의의 방식으로 결정 및/또는 추적될 수 있다. 임상的是 또한 적절한 경우에 및 사안별로, 목적하는 치료 효과를 달성하기 위해, 원치 않는 부작용을 방지, 제한 또는 저하시키기 위해, 및/또는 한편으로 목적하는 치료 효과의 달성과 다른 한편으로 원치 않는 부작용을 방지, 제한 또는 저하시키는 것 사이의 적절한 균형을 달성하기 위해 특정 치료 요법을 조정 또는 변경할 수 있을 것이다.

[0357] 일반적으로, 치료 요법은 목적하는 치료 효과가 달성될 때까지 및/또는 목적하는 치료 효과가 유지되어야 하는 만큼 오랫동안 수행될 것이다. 다시, 이는 임상的是가 결정할 수 있다.

[0358] 치료되는 대상체는 임의의 온혈 동물일 수 있지만, 특히 포유동물, 보다 특히 인간이다. 당업자에게 명백한 바와 같이, 치료할 대상체는 본원에 언급된 질환 및 장애에 걸렸거나 걸릴 위험이 있는 사람일 것이다.

[0359] 본 발명은 이제 다음 비제한적 바람직한 측면, 실시예 및 도면에 의해 추가로 기재될 것이다.

[0360] 본원에 언급되는 모든 간행물은 본원에 참조로 포함된다.

[0361] 1. 인간 및 시노물구스 CXCR2 클로닝

표 1

인간 CXCR2 서열 1	MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSSTLPPFLDAAAPCEPESLEINKYFVVIYALV FLLSLLGNSLVMVLVLYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPIWAASKVNGWIFGTFL CKVWSLLKEVNFYSGILLACISVDRYLAIVHATRRTLTKQRYLVKFCLSIWGLSLLLALP VLLFRRTVYSSNVSPACYEDMGNTANWRMLLRILPQSFVIVPLLIMLFCYGFTRLT LFKAHMGQKHRAMRVIFAVVLIFFLLCWLPPYLVLLADTLMRTQVIQETCERRNHIDRA LDATEILGILHSCLNPLIYAFIQKFRHGLLKILAIHGLISKDSLPKDSRPSFVGSSTL
인간 Δ1-17 CXCR2 서열 2	MEDLSNYSYSSTLPPFLDAAAPCEPESLEINKYFVVIYALVFLSLLGNSLVMVLVLYS RVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPIWAASKVNGWIFGTFLCKVWSLLKEVNFYSGIL LLACISVDRYLAIVHATRRTLTKQRYLVKFCLSIWGLSLLLALPVLLFRRTVYSSNVSPA CYEDMGNTANWRMLLRILPQSFVIVPLLIMLFCYGFTRLTLFKAHMGQKHRAMRV IFAVVLIFFLLCWLPPYLVLLADTLMRTQVIQETCERRNHIDRALDATEILGILHSCLNPLI YAFIQKFRHGLLKILAIHGLISKDSLPKDSRPSFVGSSTL
시노물구스 CXCR2 서열 3	MQSFNFEDFWENEDFSNYSYSSDLPPSLPDVAPCRPESLEINKYFVVIYALVFLSLL GNSLVMVLVILHSRVGRSITDVYLLNLAMADLLFALTLPIWAAAKVNGWIFGTFLCKVVS LLKEVNFYSGILLACISVDRYLAIVHATRRTLTKQRYLVKFCLSIWGLSLLLALPVLLFR RTVYLYTISPVCYEDMGNTAKWRMVLRLPQTFGFILPLLIMLFCYGFTRLTLFKAHM GQKHRAMRVIFAVVLIFFLLCWLPPYLVLLADTLMRTRLINETCQRNNIDQALDATEIL GILHSCLNPLIYAFIQKFRHGLLKILATHGLISKDSLPKDSRPSFVGSSTL

[0362]

[0363] pcDNA3.1(+) (인비트로젠(Invitrogen), V790-20)은 다양한 포유동물 세포주 내에서 고-수준의 구성적 발현을 위해 설계된다. 이는 인간 시토메갈로바이러스 극조기 프로모터, 소 성장 호르몬 (BGH) 폴리아데닐화 신호, 포유동물 세포를 위한 네오마이신 선택 마커, 및 이. 콜라이 내에서 선택을 위한 암피실린 내성 유전자를 함유한다.

[0364] pVAX1 (인비트로젠, V260-20)은 DNA 백신을 위해 설계된 플라스미드 벡터이다. 이는 인간 시토메갈로바이러스 극조기 프로모터, 소 성장 호르몬 (BGH) 폴리아데닐화 신호, 및 이. 콜라이 내에서 선택을 위한 카나마이신 내성 유전자를 함유한다.

표 2

구축물:

수용체	벡터	구축
인간 CXCR2 (N-말단 3xHA-태그)	pcDNA4/TO	pcDNA4/TO에서 각각 5' 및 3' 말단의 HindIII 및 XhoI 제한 효소 부위로 일괄된, 3개의 HA 태그를 코딩하는 DNA 서열에 이어 hu CXCR2 서열을 서브클로닝함
인간 N-말단 CCR9 키메라 CXCR2 (N-말단 3xHA-태그)	pcDNA4/TO	pcDNA4/TO에서 각각 5' 및 3' 말단의 HindIII 및 XhoI 제한 효소 부위로 일괄된, 3개의 HA 태그를 코딩하는 DNA 서열에 이어 hu CCR9에서의 처음 39개 아미노산, TEV 프로테아제 부위, N-말단 43개 아미노산을 뺀 hu CXCR2 서열을 서브클로닝함
인간 Δ 1-17 CXCR2 (N-말단 3xHA-태그)	pcDNA4/TO	pcDNA4/TO에서 각각 5' 및 3' 말단의 HindIII 및 XhoI 제한 효소 부위로 일괄된, 3개의 HA 태그를 코딩하는 DNA 서열에 이어 N-말단 17개 아미노산이 절여진 hu CXCR2 서열을 서브클로닝함
인간 CXCR2	pXoon	인간 CXCR2 (hCXCR2) cDNA (진뱅크:L19593)를 EcoR I 절단 부위를 함유하는 5' 프라이머 및 Not I 부위를 함유하는 3' 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭시킴. PCR 생성물을 pXOON 플라스미드 벡터에 라이게이션시킴.
시노물구스 CXCR2	pcDNA3.1	시노물구스 CXCR2 cDNA를 비장/흉선 시노물구스 cDNA 라이브러리로부터 증폭시킴. NotI 및 XhoI 제한 효소 부위를 PCR을 통해 추가하고, teh 생성 단편을 pcDNA3.1에 클로닝함.
인간 CXCR2	pVAX1	pXoon_hCXCR2 상의 PCR (NheI-NotI)
시노물구스 CXCR2	pVAX1	pcDNA3.1_cCXCR2로부터의 NheI-XhoI
인간 Δ1-17 CXCR2	pVAX1	pcDNA3.1_3xHA-Δ1-17-hCXCR2 상의 PCR (HindIII-XhoI)
인간 Δ1-17 CXCR2 (N-말단 3xHA-태그)	pcDNA3.1	pCR4Blunt-TOPO_3xHA-Δ1-17-hCXCR2로부터의 HindIII-XhoI
인간 CXCR2	pcDNA3.1	pVAX1_hCXCR2로부터의 NheI-XhoI

[0365]

[0366]

2. 인간 및 시노물구스 CXCR2를 발현하는 CHO, CaKi, RBL 및 HEK293T 세포주의 확립

표 3

세포주:

숙주	형질전환	수용체	벡터
CHO	안정함	인간 Δ1-17 CXCR2 (N-말단 3xHA-태그)	pcDNA3.1
HEK293T	일시적	시노물구스 CXCR2	pcDNA3.1
Caki info' to add			
/	DNA 면역화	인간 CXCR2	pVAX1
/	DNA 면역화	시노물구스 CXCR2	pVAX1
/	DNA 면역화	인간 Δ1-17 CXCR2	pVAX1
RBL	안정함	인간 CXCR2 cDNA	pSFFV-Neo
RBL -2H3	안정함	시노물구스 CXCR2 cDNA	pcDNA3.1
CHO-Trex	안정함	(HA)3-huCXCR2	pcDNA4/TO
CHO-Trex	안정함	(HA)3-huCCR9-huCXCR2	pcDNA4/TO
CHO-Trex	안정함	(HA)3-huCXCR2 ΔN1-17	pcDNA4/TO
L2071	안정함	인간 CXCR1	pSFFV neo
CEM	내인성	CXCR4	-

[0367]

[0368]

CHO-K1 Δ 1-17 인간 CXCR2 (N-말단 3xHA 태그)

[0369] CHO-K1 세포를 아맥사(Amaxa) 전기천공 시스템 (솔루션 T에서 프로그램 U 23)을 이용하여 플라스미드 pcDNA3.1\_3xHA-Δ1-17-hCXCR2로 형질감염시켰다. 형질감염된 세포 풀을 형질감염 후 제2일로부터 선택 압력 (1000 μg/mL G418) 하에 유지하였다. 8일 후에, FMAT 블루-표지된 인간 GRO-α를 사용하여 인간 CXCR2 양성 집단을 확인하였다. 인간 Gro-α의 FMAT 블루 표지 (바이오소스(Biosource), PHC1063)는 제조업체의 지침 (어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems), 4328408)에 따라 FMAT 블루 단일기능적 반응성 염료 키트를 사용하여 이루어졌다. 단세포를 팩스아리아(FACSaria) (BD 바이오사이언시스(BD Biosciences))를 사용하여 96-웰 세포 배양 플레이트 내로 분류하였다. 성장하는 클론을 FMAT 블루-표지된 인간 GRO-α를 사용하여 팩스어레이 (FACSarray) (BD 바이오사이언시스) 장치 상에서 Δ1-17 인간 CXCR2 발현에 대해 시험하였다. 최고 발현을 갖는 CHO-K1 클론을 선택하였다 (9000의 MCF 값).

[0370] HEK293T 시노물구스 CXCR2

[0371] HEK293T 세포를 퓨젠(FuGene) HD 형질감염 시약 (로슈(Roche))을 사용하여 플라스미드 pcDNA3.1\_cCXCR2로 형질 감염시켰다. 형질감염의 2일 후에, 세포를 50 nM FMAT 블루 표지된 GRO-α를 사용하여 팩스어레이 (BD 바이오 사이언시스) 장치 상에서 cCXCR2 발현에 대해 시험하였다. 우수한 발현을 갖는 세포 (약 12000의 MCF 값)를 추가로 사용하였다.

[0372] RBL-2H3 시노물구스 CXCR2

[0373] 래트 호염기구 백혈병 세포 (RBL-2H3) (37°C/5% CO<sub>2</sub>에서 성장시키고 1X 비-필수 아미노산, 0.15% 중탄산나트륨, 1mM 피루브산나트륨 및 15% 태아 소 혈청 (인비트로젠)을 보충한 MEM 이글(Eagle) 배지 (인비트로젠) 내에서 통상적으로 계대배양함)를 제조업체의 프로토콜에 따라 전기천공 (아맥사 바이오시스템즈(Amaxa Biosystems))에 의해 핵형질감염시켰다. 형질감염된 세포를 37°C/5% CO<sub>2</sub>에서 인큐베이션하고, 형질감염의 24시간 후에, 케네티 신(Geneticin)을 1 mg/mL의 최종 농도로 첨가함으로써 항생제 선택을 개시하였다. 형질감염된 세포를 성장시키고, 선택 배지 내에서 3-5일 동안 계대배양한 후, 96-웰 플레이트 내로 연속 희석함으로써 단일-세포 분류하였다. 대략 2주 후에, 활발하게 성장하는 콜로니를 확장시키고, 시노CXCR2 전사체 발현에 대해 후속적으로 분석하였다. 이어서, 양성 클론을 분석을 위해 추가로 확장시켰다.

[0374] CHO-Trex (HA)3-huCXCR2 및 (HA)3huCCR9-CXCR2 하이브리드

[0375] 차이니즈 햄스터 난소 T-Rex (T-Rex™-CHO, 인비트로젠, #R718-07)를 37°C에서 10% 테트라시클린-무함유 태아 소 혈청 (FBS) (바이오세라(Biosera)), 1% 페니실린/스트렙토마이신 & 10 μg/mL의 블라스티시딘(Blasticidin)을 보충한, 2 mM L-글루타민을 함유하는 햄 F12 배지 내에서 단층 배양액으로 유지하였다. 이러한 테트라시클린-조절된 발현 (T-Rex™) 세포주는 테트라시클린 리프레서 (TetR)를 안정하게 발현한다. 이어서, CXCR2 구축물 둘 다를 발현하는 안정한 세포주는 핵형질감염 절차 (세포주 핵형질감염 키트 T, 아맥사 바이오시스템, 프로그램 U-23)를 이용하여 생산하였다. 형질감염된 세포를 37°C/5% CO<sub>2</sub>에서 인큐베이션하고, 형질감염의 48시간 후에 300 μg/mL의 제오신(Zeocin)으로 처리하였다. 양성 형질전환체의 선택을 허용하기 위해 세포를 2주 동안 제오신의 존재 하에 배양하고, 이 후에 Mo-Flo FACS 분류기를 사용하여 단일-세포 분류를 수행하였다. 2주 후에, 300 μg/mL의 제오신 농도에서 그의 규정 배지 내에 유지시키면서 활발하게 성장하는 콜로니를 확장시켰다.

[0376] 3. 인간 Gro-α, 시노물구스 Gro-α, 인간 IL-8, 인간 ENA-78

**표 4**

NVTS - IL-8, ENA-78, 시노물구스 Gro-α

리간드	코멘트	공급원
인간 GROα	제조함	바이오소스(Biosource) (PHC1063)
인간 IL-8	제조함	노파르티스 비엔나(Novartis Vienna)
인간 ENA-78	제조함	페프rote크 리미티드(Peprotech ltd) (300-22)
시노 GROα	제조함	ALMAC 사이언시스(ALMAC Sciences)

[0377]

[0378] 4. 펩티드

[0379] 인간 및 시노물구스 CXCR2의 상이한 N-말단 및 세포의 루프 (EL) 스트레치를 제시하는 펩티드는 바켄(Bachem)으로부터 주문하였다 (표 5). "시클릭"으로 지시된 펩티드에서, 처음 및 마지막 아미노산은 시스테인 잔기로 교

체되고, 야생형 서열의 자연 발생 내부 시스템은 류신 잔기로 교체되었다. 이들 펩티드는 시스템 잔기의 플랭킹을 통해 고리화되었다.

표 5

명칭	서열	변형
시노물구스 1 내지 14	<b>MQSFNFEDFWENED</b> 서열 4	비오린에 C-말단적으로 접합됨
시노물구스 EL3 시클릭	<b>CTLMRTRLINETLQRRNC</b> 서열 5	비오린 또는 KLH에 N-말단적으로 접합됨
시노물구스 EL2 시클릭	<b>CRRTVYLYTISPVLVEDMGNNTALWC</b> 서열 6	비오린 또는 KLH에 N-말단적으로 접합됨
인간 1 내지 19	<b>MEDFNMESDSFEDFWKGED</b> 서열 7	비오린에 C-말단적으로 접합됨
인간 18 내지 48	<b>EDLSNYSYSSTLPPFLDAAPCEPESLEI NK</b> 서열 8	비오린에 C-말단적으로 접합됨
인간 EL2	<b>FRRTVYSSNVSPACYEDMGNNTANWR</b> 서열 9	비오린 또는 KLH에 N-말단적으로 접합됨
인간 EL2 시클릭	<b>CRRTVYSSNVSPALYEDMGNNTANWC</b> 서열 10	비오린 또는 KLH에 N-말단적으로 접합됨
인간 EL3	<b>DTLMRTQVIQETCERRNH</b> 서열 11	비오린 또는 KLH에 N-말단적으로 접합됨
인간 EL3 시클릭	<b>CTLMRTQVIQETLERRNC</b> 서열 12	비오린 또는 KLH에 N-말단적으로 접합됨

[0380]

[0381]

5. 번역화

[0382]

3마리의 라마를 인간 CXCR2를 발현하는 포유동물 세포로 7 내지 9회 번역화시키고, 1마리의 라마를 시노물구스 CXCR2를 발현하는 포유동물 세포로 6회 번역화시켰다. 이러한 요법에 이어 (불)완전 프로인트(Freund) 아주반트 내에 혼합된 펩티드-키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH) 접합체 각테일을 4회 투여하였고, 이 펩티드는 인간 및 시노물구스 CXCR2 둘 다의 세포의 루프 번호 2 및 3을 제시한다 (표 5 참조). 8마리의 다른 라마를 인간 전장 CXCR2 또는 pVAX1로부터 발현된 Δ1-17 CXCR2를 코딩하는 DNA로 4 내지 5회 번역화시킨 후, 인간 전장 CXCR2를 발현하는 포유동물 세포를 1회 투여하였다. 추가로 3마리의 라마를 pVAX1로부터 발현된 시노물구스 CXCR2를 코딩하는 DNA로 4회 번역화시킨 후, 시노물구스 CXCR2를 발현하는 포유동물 세포를 1회 투여하였다. 번역 혈액 및 림프절 샘플을 각각의 항원의 투여 4 및 8일 후에 취하였다.

[0383]

6. 라이브러리 구축

[0384]

cDNA 샘플을 번역 혈액 및 림프절 샘플의 전체 RNA 제제로부터 제조하였다. 나노바디를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 프라이머 ABL051, ABL052 및 ABL003을 사용하는 1-단계 RT-PCR 반응으로 인간 또는 시노물구스 CXCR2로 번역화시킨 모든 라마의 cDNA 샘플로부터 증폭시켰다. 프라이머 서열을 표 6에 제시한다. 샘플 내의 IgG2 및 IgG3 cDNA로부터 증폭된 700bp 앰플리콘을 겔로부터 단리하고, 후속적으로 SfiI 제한 효소 부위를 함유하는 ABL050 프라이머, 및 ABL003 프라이머를 사용하는 네스티드 PCR 반응에서 주형으로 사용하였다. PCR 생성물을 후속적으로 SfiI 및 BstEII (VHH 유전자의 FR4 내에 자연 발생함)로 소화시키고, 파지미드 벡터 pAX50의 상응하는 제한 부위 내로 라이게이션시켜, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) TG-1 내에서 전기천공 후에 라이브러리를 얻었다. pAX50은 LacZ 프로모터, 콜라이파지 pIII 단백질 코딩 서열, 암피실린 또는 카르베니실린에 대한 내성 유전자, 다중클로닝 부위 및 gen3 리더 서열을 함유하는 pUC119로부터 유래된 발현 벡터이다. 나노바디® 코딩 서열과 프레임에 맞게, 벡터는 C-말단 c-myc 태그 및 (His)6 태그를 코딩하였다. 파지미드 벡터는 geneIII 생성물과의 융합 단백질로서 개별 나노바디를 발현하는 파지 입자의 생산을 허용한다.

표 6

프라이머 서열

ABL051	GGCTGAGCTGGGTGGTCCTGG	서열 13
ABL052	GGCTGAGTTTGGTGGTCCTGG	서열 14
ABL003	GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC	서열 15
ABL050	CATTTGAGTTGGCCTAGCCGGCCATGGCAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGG	서열 16
M13Fwd	TGTA AACACGACGGCCAGT	서열 17
M13Rev	CAGGAAACAGCTATGACC	서열 18
Rev_30GlySer	TCAGTAACCTGGATCCCCGCCACCGCTGCCTCCACCGCCGCTACCCCCGCCACCGCTGCCTCCACCGCTGAGGAGACGGTGACCTG	서열 19
For_GlySer35	AGGTTACTGAGGATCCGGCGGTGGAGGCAGCGAGGTGGGGGCTCTGGTGGCGG GGGTAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG	서열 20
Fwd-EVQL-MfeI	GAGGTGCAATTGGTGGAGTCTGGG	서열 21
Rev-TVSS-BstEII	TGAGGAGACGGTGACCTGGGTCCC	서열 22
Fwd-EVQL-BamHI	TCTTGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGG	서열 23
Rev-TVSS-BspEI	ACCGCTCCGGAGGAGACCGTGACCTGGGTCCC	서열 24

[0385]

[0386]

7. 선택

[0387]

박테리오파지의 표면 상에 발현된 상기 언급한 pAX50 나노바디 라이브러리를 CXCR2 에피토프를 제시하는 펩티드, 막 추출물 및 전세포를 사용하여 선택하였다.

[0388]

펩티드를 사용하는 선택은 뉴트라비딘-코팅된 (피어스(Pierce), 31000) 맥시소르프(Maxisorp) 마이크로타이터 플레이트 (눈크(Nunc), 430341) 상에 포획된 0-1000 nM의 비오틴화 펩티드 (표 5 참조) 상에서 파지 라이브러리를 인큐베이션하는 것으로 이루어졌다. 대안적으로, 파지 라이브러리를 용액 내에서 10nM 비오틴화 펩티드와 함께 인큐베이션한 후, 스트렙타비딘 코팅된 디나비즈(Dynabeads) (인비트로젠, 112-06D) 상에서 펩티드-파지 복합체의 포획을 수행하였다. 차단은 1% 카세인을 보충한 PBS를 사용하여 수행하였다. 라이브러리로부터 제조된 파지를 첨가하고, 1시간 동안 (0.1% 카세인 및 0.1% 트윈20을 보충한 PBS 내에서) 인큐베이션하였다. 미결합 파지를 (0.05% 트윈20을 보충한 PBS를 사용하여) 세척 제거하고; 결합된 파지를 15분 동안 트립신 (PBS 중 1mg/ml)을 첨가하여 용리시켰다. 제2 선택 라운드는 본질적으로 상기 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0389]

막 추출액을 사용하는 선택은 이뮤노튜브 (눈크, 444474)를 인간 CXCR2를 발현하는 세포 (퍼킨 엘머(Perkin Elmer), ES-145-M400UA 및 6110524400UA)로부터 제조된 50 ug/mL (전체 단백질) 막 추출액으로 코팅함으로써 수행하였다. 음성 대조군으로서, 인간 FPR1을 발현하는 CHO 세포 (퍼킨 엘머, 6110527400UA)로부터 제조된 막 추출액을 병행 코팅하였다. 차단은 4% 마벨(Marvel) 탈지유 분말을 보충한 PBS를 사용하여 수행하였다. 파지를 2시간 동안 (1% 마벨을 보충한 PBS 내에서) 인큐베이션하였다. 미결합 파지를 PBS로 세척 제거하고; 결합된 파지를 15분 동안 트립신 (PBS 중 1mg/ml)을 첨가하여 용리시켰다. 제2 라운드 선택은 본질적으로 상기 기재된 바와 같이 수행하였다. 일부 경우에, 비관련 세포 배경 에피토프에 결합하는 파지는 파지를 대조 막 추출액으로 코팅한 연속적 튜브 또는 웰 상에 예비-흡수시킴으로써 특이적으로 고갈시켰다. 이어서, 코팅된 인간 CXCR2 막 추출물 상의 인큐베이션을 용액 내에서 대조 막 추출물의 존재 하에 수행하였다. 다른 실험에서, 펩티드에 대한 1 또는 2 라운드의 선택에 이어 막 추출물에 대한 1 라운드의 선택을 수행하거나 그 반대로 수행하였다.

[0390]

또 다른 실험 세트에서, 인간 또는 시노물구스 CXCR2를 발현하는 1 내지 5백만개의 포유동물 세포를 파지 라이브러리와 함께 10% FBS 및 1% 마벨 탈지유 분말을 보충한 PBS 내에서 인큐베이션하였다. 형질전환되지 않은 세포주를 음성 대조군으로서 사용하였다. 미결합 파지를 PBS로 세척 제거하고; 결합된 파지를 15분 동안 트립신 (PBS 중 1mg/ml)을 첨가하여 용리하였다. 제2 라운드는 본질적으로 상기 기재된 바와 같이, 그러나 제1 라운드와 상이한 세포주 배경에 대해 수행하였다.

[0391]

다른 실험에서, 파지를 펩티드에 의해 제시된 영역에 결합하는 나노바디를 발현하는 파지를 고갈시키기 위해 용액 내에서 1µM의 펩티드 (표 5 참조)의 존재 하에 CXCR2를 발현하는 포유동물 세포 또는 막 추출액과 함께 인큐베이션하였다.

[0392] 8. 주변세포질 추출물의 제조

[0393] 용리된 파지로 지수 성장하는 TG-1 세포를 감염시키고, 이어서, 이를 카르베니실린 함유 LB 한천 플레이트 상에 플레이트하였다. 카르베니실린-내성 클론을 삽입체의 존재에 대해 분석하고, 양성 클론의 서열을 확인하였다. 관심 클론을 카르베니실린을 보충한 TB 배지 내에서 성장시키고, IPTG의 첨가에 의해 발현을 유도하였다. 37°C에서 4시간 동안 계속 발현시킨 후, 세포를 원심분리하였다. 이. 콜라이 발현 배양액으로부터 밤새 동결시킨 세포 펠릿을 PBS (원래의 배양액 부피의 1/10) 내에 용해시키고, 부드러운 진탕 조건 하에 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 1회 더 원심분리하고, 주변세포질 공간 내로 분비된 단백질을 함유하는 상청액을 저장하였다.

[0394] 9. 스크리닝

[0395] 주변세포질 추출액 (상기 기재된 바와 같음)을 FACS 상에서 인간 CXCR2에 대한 결합에 있어서 Gro- $\alpha$ 와의 경쟁에 대해 분석하였다.  $2 \times 10^5$  개 세포를 FACS 완충제 (PBS + 10% 태아 소 혈청 (시그마(Sigma), F7524)) 내에서 주변세포질 추출액의 1/2 희석액과 30분 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. 이어서, FACS 완충제 내의 동일 부피의 6nM의 FMAT 블루-표지된 인간 Gro- $\alpha$ 를 첨가하고, 추가로 30분 동안 4°C에서 암실에서 계속 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 FACS 완충제에서 3회 세척하고, 최종적으로 FACS 완충제 내에 재현탁시켰다. 사멸된 세포를 아이오딘화프로피듐 (시그마, P4170)로 염색하였다. 이어서, 샘플을 팩스어레이 (BD 바이오사이언시스) 상에서 분석하였다. 표 7은 그의 주변세포질 추출물이 인간 CXCR2에 대해 Gro- $\alpha$ 와 경쟁을 보인 나노바디를 열거한다.

표 7

인간 CXCR2 (주변세포질 추출물) 상의 Gro- $\alpha$  경쟁

명칭	FACS Gro- $\alpha$ 경쟁 (억제 %)
126B11	36.9
97A9	85.9
127D1	46.7
137B7	90.3
137A8	55.8
139A8	78.5
139D5	56.8
139H2	50.5
143A5	72.6
143B3	70.8
159B10	75.8
144D1	32.7
145D3	77.9
147A1	58.3
146A6	42.7
145C9	53.5
163D2	86.8
163E3	80.1
2B2	38.1
빈 대조군	0.4

[0396]

[0397] 또 다른 설정에서, 주변세포질 추출액을 ELISA에 의해 인간 1 내지 19 펩티드에 대한 결합에 대해 분석하였다. 맥시소르브 플레이트 (논크, 430341)를 2시간 동안 뉴트라비딘으로 코팅한 후, 1시간 차단하였다 (PBS, 1% 카세인). 이어서, 100 nM 비오틴화 인간 1 내지 19 펩티드를 이들 플레이트에 1시간 동안 첨가한 후 (PBS, 0.1% 카세인, 0.05% 트윈20), 주변세포질 추출액의 10배 희석액과 1시간 인큐베이션하였다. 미결합 주변세포질 추출액을 세척 제거하고 (0.05% 트윈20을 보충한 PBS), 결합된 나노바디를 마우스 항-myc (로슈, 11667149001)에 이어 토끼 항-마우스-HRP 접합체 (다코사이토메이션(Dakocytomation), P0260)를 사용하여 검출하였다. 표 8은 비관련 대조 나노바디에 비해 항-CXCR2 나노바디의 결합 신호의 비를 요약한다.

**표 8**

주변세포질 추출물의 인간 CXCR2 1 내지 19 펩티드에 대한 결합

명칭	1-19 Nter 펩티드 ELISA (빈 대조군에 대한 결합 신호의 비)
<b>54B12</b>	75.5
<b>53E7</b>	13.3
<b>97A9</b>	0.8
<b>127D1</b>	39.5
<b>137B7</b>	1.0
<b>137A8</b>	1.2
<b>139A8</b>	1.0
<b>139D5</b>	0.8
<b>139H2</b>	1.7
<b>159B10</b>	0.8
<b>163D2</b>	0.5
<b>163E3</b>	0.6
<b>2B2</b>	58.6

[0398]

[0399] 10. 서열

표 9

1가 항-CXCR2 나노바디의 서열

143B03	서열 25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYWMYVWRQAPGKGLDWSAINAGGDSTYYADPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCATVRGTARDLDYWGQGTQVTVSS
139D05	서열 26	EVKLVESGGGLVQAGGSLRLSCALSGRIGSINAMGWYRQVSGQQR ELVAVSRSGGSDIADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCYAHTSSYSNWRVYNNDYWGQGTQVTVSS
146A06	서열 27	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLTCAASGRIGTINAMGWYRQAPGKQR ELVAVITSGGRIDYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYNVETVVGAVYWGQGTQVTVSS
147A01	서열 28	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRMGINAMGWYRQAPGKER ELVAKITRGGAITYADSVKGRFTIARDNINLNTAYLQMNDLKPEDTAVYYYNVDGGPSQNYWGQGTQVTVSS
145C09	서열 29	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIQWFRQAPGKERE RVSCISGSDGSTYYADSVKGRFTISSDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAAYWGLTLRLWMPPHRYDYWGQGTQVTVSS
145D03	서열 30	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLIFRLSGMAWYRQAPGRQR EWWAVLTKDGLHYADPVKGRFTISRNNAEWTWYLQMNLSLKPEDTAVYYCNTGRYWGQGTQVTVSS
144D01	서열 31	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGTIGTIRAMGWYRQAPGKQRE LVALITSTGRINYADSVKGRFTIGRDNKNTAYLQMNLSLKPEDTAVYYNIETLRRNYWGQGTQVTVSS
139H02	서열 32	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYAMGWFRQATGKEREFVAI NKSGGNTHYAGSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAASRTNPKPDYWGQGTQVTVSS
139A08	서열 33	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFRSAMGWLQAPGKEREFVAG ISWGGDINSYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMNLSLKPEDTAVYYCAARYRGGAAVAGWEYWGQGTQVTVSS
137A08	서열 34	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTLAYTGVWFRRAPGKEREGISCSISDGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADRRTDCKKGRVSGSGSWGQGTQVTVSS
143A05	서열 35	KVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFNYYVMAWFRQAQGKEREFVAI STRGSMTKYSDSVQGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKPEDTAVYYCAADPRGSSWSFSSGGYDYWGQGTQVTVSS
137B07	서열 36	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQPGKAREWVAGI NSDGTNTYADPVKGRFTISRDNKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYCASGKYRGGTQVTVSS
127D01	서열 37	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFDKVMGWYRQPPGKQREGVAA IRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCKVNIRGGDYWGQGTQVTVSS
126B11	서열 38	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGSFRINTMGWYRRAPGKQRELVAAR DRGGYINYVDSVKGRFTVSRDNKPTMYLQMNLSLKPEDTAVYYCHAGTQDR TGRNFDHWGQGTQVTVSS
097A09	서열 39	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQRELVA DITSGGNINIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNAEIVLVGV WTQRARTGNVWGQGTQVTVSS
159B10	서열 40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSLSMGWFRQAPGKERAFVAA LTRNGGYRYADSVKGRFTISRDAKKTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADSLSGSDYLGTNLDYWGQGTQVTVSS
163D02	서열 41	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAI TWNGGRVFTASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADKDR RTDYLGHVPA YWGQGTQVTVSS
163E03	서열 42	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAI TWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAAGGS

[0400]

		SWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
2B2	서열 43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIL TINAMGWYRQAPGKQRELVRR TRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKTMYLQMNLSLKPEDTAVYYCMLDDRGGV YWGQGTQVTVSS
54B12	서열 90	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGSFRINTMGWYRRAPGKQRELVAAR DRGGYINYVDSVKGRFTVSRDNKPTMYLQMNLSLKPEDTAVYYCHAGTQDR TGRNFDHWGQGTQVTVSS

[0401]

[0402]

1가 나노바디의 특성화로 이어짐

[0403]

11. 1가 나노바디의 구축

[0404]

Fwd-EVQL-MfeI 및 Rev-TVSS-BstEII 프라이머를 사용하여 기능적 파지미드 클론에 대한 PCR에 의해 얻어진 나노바디 함유 DNA 단편 (표 1)을 MfeI 및 BstEII로 소화시키고, pAX100 벡터 내로 라이게이션시키고, 이. 콜라이

TG-1 컴피턴트 세포 내로 형질전환시켰다. pAX100은 LacZ 프로모터, 카나마이신에 대한 내성 유전자, 다중클로닝 부위 및 OmpA 리더 서열을 함유한 pUC119로부터 유래된 발현 벡터이다. 나노바디 코딩 서열과 프레임에 맞게, 벡터를 C-말단 c-myc 태그 및 His6 태그에 대해 코딩하였다. 카나마이신 내성 클론을 삼입체의 존재에 대해 분석하고, 양성 클론의 서열을 검증하였다.

[0405] 12. 소규모 발현

[0406] 관심 나노바디를 코딩하는 발현 벡터를 함유하는 TG-1 세포를 TB 배지 플러스 100 µg/ml 카나마이신을 함유하는 배플 진탕기 플라스크 내에서 성장시키고, 1mM IPTG를 첨가하여 발현을 유도하였다. 4시간 동안 37°C에서 계속 발현시켰다. 세포를 수집한 후에, 주변세포질 추출액을 제조하고, His6-태그부착된 나노바디를 고정화된 금속 친화도 크로마토그래피 (히스트랩 FF 크루드(HisTrap FF Crude), 지이 헬스케어(GE Healthcare))에 이어 PBS 내에서 탈염 (하이프랩(HiPrep) 26/10, 지이 헬스케어) 또는 겔 여과 크로마토그래피 (슈퍼덱스(Superdex) 75 HR16/10, 지이 헬스케어)에 의해 정제하였다.

[0407] 13. 리간드 경쟁 검정

[0408] 정제된 1가 항-CXCR2 나노바디를 인간 및 시노물구스 CXCR2에 대한 FACS 리간드 경쟁 검정으로 3 nM FMAT-블루-표지된 Gro-α에 대해 적정하였다 (표 10). 인간 CXCR2에 대해 차단 효력은 두자릿수 nM 내지 nM 미만 범위인 반면, 시노물구스 CXCR2에 대해 한자릿수 내지 두자릿수 nM 범위이다.

표 10

1가 항-CXCR2 나노바디의 리간드 경쟁 효능

	인간 CXCR2		시노물구스 CXCR2	
	IC50 (M)	최대 억제 %	IC50 (M)	최대 억제 %
137B7	1.11E-09	93.5	NA	NA
163D2	6.95E-09	96.4	1.48E-08	91.0
127D1	3.09E-10	61.1	4.41E-09	82.6
97A9	1.72E-08	93.9	6.41E-08	53.0
163E3	8.96E-09	92.4	1.48E-08	83.5
54B12	8.57E-10	35.0	3.95E-08	63.0
2B2	2.07E-09	42.7	3.16E-08	64.0

NA: 활성을 측정할 수 없음

[0409]

[0410] 14. 제조합 세포주를 사용하는 기능적 검정

[0411] (1) 세포내 칼슘의 효능제 유도된 방출 측정 (FLIPR)

[0412] 인간 또는 시노물구스 CXCR2 수용체를 발현하는 RBL 세포를 96-웰 플레이트에 접종하고, 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 실험 당일에, 세포에 Fluo-4 염료를 30분 동안 37°C에서 로딩한 후, 정제된 1가 항-CXCR2 나노바디와 30분 인큐베이션하였다. 최종적으로, GRO-α의 첨가를 형광측정 영상화 플레이트 판독기 (FLIPR)를 사용하여 수행한 후, 세포내 칼슘의 방출에 대응하는 형광 신호를 검출하였다. 선택성 검정은 인간 CXCR1을 발현하는 L2071 세포를 사용하여 수행하였다. 검정 프로토콜은 CXCR2에 대해 기재된 것과 동일하게 유지되었지만, IL-8을 효능제로서 사용하였다. 평균 IC<sub>50</sub> 값의 요약은 표 11에 제시하고, 추가로 시험한 어떠한 나노바디도 시험한 농도 (1 µM 최대 농도)의 CXCR1 수용체에서 세포내 칼슘의 효능제 유도된 방출의 임의의 억제를 보이지 않았다.

[0413] (2) [<sup>35</sup>S]GTP γS의 효능제 자극된 추적 측정

[0414] 정제된 1가 항-CXCR2 나노바디를 96-웰 플레이트 내에서 GRO-α, GDP, SPA 비드, 및 인간 CXCR2 수용체를 발현하는 CHO 세포로부터 제조된 CHO-CXC2 막과 60분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, [<sup>35</sup>S]GTP γS를 첨가하고, 추가로 60분 인큐베이션하였다. 최종적으로, 플레이트를 원심분리한 후 탑카운트 상에서 판독하였다. 평균 IC<sub>50</sub> 값의 요약은 표 11에 제시한다.

표 11

제조합 세포주를 이용하는 기능적 검증에서 정제된 1가 항-CXCR2 나노바디스® 에 대한 IC<sub>50</sub> 값

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

\* 시험된 농도에서 정제기가 수득되지 않은 경우에 곡선을 100% 억제에 고정시킨. NA - 활성을 측정할 수 없음. ND - 결정되지 않음.

[0415]

[0416]

15. 1차 호중구를 사용하는 기능적 검증

[0417]

(1) 인간 호중구 전혈 형상 변화 검증 (hWBSC)

[0418]

공여자는 전신 약물을 투여하지 않은 건강한 정상 지원자였다 (노파르티스 호삼 공여자 패널). 52 mM EDTA (평균)로 항응고 처리한 전혈을 1mL EDTA 대 9mL 혈액의 비로 수집하였다. 혈액을 실온에서 수집하고 사용 전에 37°C로 예온하였다. 80 μL의 전체 혈액을 CXCR2 나노바디와 함께 10분 동안 실온에서 예비-인큐베이션한 후 (용량 반응당 10개 점 (0.03-1.144 x 10<sup>-7</sup> μM), 케모카인으로 자극하였고; 10 μL rhGRO α (2 nM 근사 EC<sub>70</sub> 농도)를 10 μL 형상 변화 검증 완충제를 첨가한 제로 화합물을 제외한 모든 웰에 첨가하였다. 샘플을 부드럽게 진탕하고, 추가로 5분 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 이어서, 튜브를 얼음 상에 놓고, 250 μL의 빙냉 최적화된 셀픽스(CellFix)<sup>TM</sup> 용액을 부드럽게 진탕시킨 튜브에 첨가하고, 추가로 5분 동안 인큐베이션하고, 그 후 1.4 mL의 1X 염화암모늄 용해 용액을 모든 튜브에 첨가하고, 얼음 상에 추가로 20분 동안 두었다. 적혈구 용해 후에, 샘플을 팩스칼리버(FACSCalibur) 유동 세포측정기 (벡톤 디킨슨) 상에서 분석하였다. 세포 집단을 전면 산란검출기/측면 산란검출기 (FSC/SSC) 게이팅에 이어, 제1 플롯으로부터 게이팅된 과립구를 사용하는 FSC/FL-2 플롯에 의해 확인하였다. 호중구는 FL-2 플롯 상에서 호산구로부터 구분되었고, 이는 후자가 더 높은 자가형광을 갖기 때문이다. 샘플당 5000개 사건이 계수되었다.

[0419]

(2) 인간 호중구 화학주성 검증

[0420]

공여자는 전신 약물을 투여하지 않은 건강한 정상 지원자였다 (노파르티스 호삼 공여자 패널). 52 mM EDTA (평균)로 항응고 처리한 전혈을 1mL EDTA 대 9mL 혈액의 비로 수집하였다. 백혈구를 표준 프로토콜을 이용하여 분리하였다: 4% 텍스트란을 20mL 항응고 처리한 혈액에 첨가하고, 부드럽게 혼합한 후, 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하여, 적혈구를 침전시켰다. 이어서, 말초 혈액 단핵 세포 (PMN)를 함유하는 상청액을 피콜-파크(Ficoll-Paque)<sup>®</sup> 밀도 구배 상에 적층시키고, 300 x g에서 25분 동안 18°C에서 원심분리하였다. PMN 풍부 분획을 500 μL 1X PBS 내에 재현탁하고, 저장성 쇼크를 이용하여 적혈구 용해를 수행하였다. 20 mL 빙냉 멸균 내독소-무함유 증류수를 펠릿에 첨가하고, 30-40초 동안 용해가 일어나도록 한 후, 20 mL 2X PBS를 첨가하였다. 샘플을 부드럽게 혼합하고, 300 x g에서 10분 동안 18°C에서 원심분리하여 과립구를 얻었다. 과립구 펠릿을 500 μL 1x PBS 내에 재현탁하고, 50 mL의 x1 PBS로 2회 세척하였다. 과립구 펠릿을 RPMI 1640 (pH 7.4) 플러스 2.5% FBS 내에 재현탁하고, 계수하고, 2e<sup>6</sup>/mL의 최종 농도로 희석하였다. 3 μm PET 막 (벡톤 디킨슨)을 갖는 트랜스웰 플레이트를 사용하여 이동을 측정하였다. 간략하게, 6 nM의 GRO α (EC<sub>80</sub>-EC<sub>100</sub>)를 플레이트의 하부 웰 (1000 μL/웰)에 첨가한 후, 멀티웰 삽입물을 위치로 낮춘 후, 변화하는 농도의 나노바디 (1가에 대해 0.13-1000 nM 또는 이중파라토프에 대해 0.6pM-30 nM)와 30분 동안 RT에서 예비-인큐베이션한 PMN을 삽입물에 첨가하였다 (500 μL/웰). 이어서, 플레이트를 37°C에서 90분 동안 인큐베이션하고, 하부 챔버로 이동한 세포를 팩스칼리버 유동 세포측정기를 사용하여 계수하였다. 유동 세포측정기는 샘플당 20초의 설정 시간 동안 FSC/FL-2 플롯 상에서 R2 게이트 내의 사건의 수를 계수하도록 설정하였다.

[0421] (3) 시노물구스 호중구 전혈 형상 변화 검정 (시노WBSC)

[0422] 3.8% 시트르산나트륨 (멸균)으로 항응고 처리한 전완 또는 하지로부터 취한 정맥 혈액을 1mL 시트르산나트륨 대 9mL 혈액의 비로 첨가하였다. 혈액을 실온에서 수집하고 사용 전에 37°C로 예온하였다. 80 µL의 전혈을 CXCR2 나노바디와 함께 10분 동안 실온에서 예비-인큐베이션한 후 (용량 반응당 10개 점 (0.03-1.144 x 10<sup>-7</sup> µM), 케모카인으로 자극하였고; 10 µL rhGROα (30 nM 근사 EC<sub>70-90</sub> 농도)를 10 µL 형상 변화 검정 완충제를 첨가한 제로 화합물을 제외한 모든 웰에 첨가하였다. 샘플을 부드럽게 진탕하고, 추가로 5분 동안 37°C에서 인큐베이션 하였다. 이어서, 튜브를 얼음 상에 놓고, 250 µL의 빙냉 최적화된 셀픽스™ 용액을 부드럽게 진탕시킨 튜브에 첨가하고, 추가로 5분 동안 인큐베이션하고, 그 후 2 mL의 용해 완충제 (시그마 알드리치(Sigma Aldrich) #R7757)를 모든 튜브에 첨가하고, 얼음 상에서 추가로 40-60분 동안 두었다. 적혈구 용해 후에, 샘플을 팩스칼 리버 유동 세포측정기 (벡톤 디킨슨) 상에서 분석하였다. 세포 집단을 전면 산란검출기/측면 산란검출기 (FSC/SSC) 게이팅에 이어, 제1 플롯으로부터 게이팅된 과립구를 사용하는 FSC/FL-2 플롯에 의해 확인하였다. 호중구는 FL-2 플롯 상에서 호산구로부터 구분되었고, 이는 후자가 더 높은 자가형광을 갖기 때문이다. 샘플당 5000개 사건이 계수되었다.

표 12

1차 호중구 및 rhGROα를 사용하는 기능적 검정에서 정제된 1가 항-CXCR2 나노바디에 대한 IC<sub>50</sub> 값

	인간 WBSC IC <sub>50</sub> (nM)	시노물구스 WBSC IC <sub>50</sub> (nM)	인간 화학주성 IC <sub>50</sub> (nM)
<b>163D2</b>	6.6 ± 3.1	>100	ND
<b>127D1</b>	4.9 ± 2.9	>100	14 ± 9.4
<b>97A9</b>	11.6 ± 5.47	>100	48.5 ± 31
<b>163E3</b>	9.4 ± 6.2	>100	9.3 ± 4
<b>54B12</b>	19.7	>100	ND
<b>2B2</b>	29.5 ± 23.4	>100	212 ± 121

[0423]

[0424] 다가 나노바디

[0425] 16. 2가 나노바디의 구축

[0426] 2가 나노바디를 구축하기 위해 2가지 접근법을 사용하였다.

[0427] PCR 증폭을 1가 빌딩 블록을 코딩하는 플라스미드 DNA 상에서 수행하였다. N-말단 빌딩 블록은 Fwd-EVQL-MfeI 및 GlySer 링커의 일부를 코딩하는 역방향 프라이머를 사용하여 증폭시킨 반면, C-말단 빌딩 블록은 GlySer 링커의 나머지 부분을 코딩하는 정방향 프라이머 및 Rev-TVSS-BstEII를 사용하여 증폭하였다 (표 6). N-말단 단편을 MfeI 및 BamHI로 소화시키고, C-말단 단편을 BamHI 및 BstII로 소화시킨 후; 이들을 pAX100 벡터 내로 동시에 라이게이션시키고, 이. 콜라이 TG-1 컴피턴트 세포 내로 형질전환시켰다.

[0428] 대안적으로, 상이한 PCR 증폭을 1가 빌딩 블록을 코딩하는 플라스미드 DNA에 대해 수행하였다. N-말단 빌딩 블록을 Fwd-EVQL-MfeI 및 Rev-TVSS-BspEI를 사용하여 증폭시킨 반면, C-말단 빌딩 블록은 Fwd-EVQL-BamHI 및 Rev-TVSS-BstEII를 사용하여 증폭시켰다 (표 6). N-말단 단편은 MfeI 및 BamHI로 소화시키고, C-말단 단편은 BspEI 및 BstII로 소화시켰다. N-말단 단편을 GlySer 링커에 대한 코딩 정보를 함유하는 pAX100-유도체 내로 라이게이션시키고 (MfeI-BspEI), 이. 콜라이 TG-1 컴피턴트 세포 내로 형질전환시켰다. 이러한 형질전환 혼합물로부터의 플라스미드 DNA를 제조하고, BspEI 및 BstEII로 소화시킨 후, C-말단 단편을 pAX100 벡터 내로 라이게이션시키고, 이. 콜라이 TG-1 적격 세포 내로 형질전환시켰다.

[0429] 카나마이신 내성 클론을 삼입물의 존재에 대해 분석하고, 양성 클론의 서열을 확인하였다.

[0430] 17. 다가 항-CXCR2 나노바디의 서열

표 13

CXCR2001 1	97A9-35GS- 97A9  서열 44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNA EIVVLGVVWTRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSSG GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASG SIVRINTMGWYRQTPGKQRELVADITSGGNINIDAVKGRFTISRDNKNT TVYLQMNLSKPEDTAVYYCNAEIVVLGVVWTRARTGNYWGQGTQVTV VSS
CXCR2001 2	137B7-35GS- 137B7  서열 45	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGP GKAREW VAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYCA SGKYRGGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGP GKAREWVAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNKNTIYLHMDMLKPED TAVYYCASGKYRGGTQVTVSS
CXCR2001 3	2B2-35GS- 97A9  서열 46	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNLSKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSSG GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWY RQTPGKQRELVADITSGGNINIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSK PEDTAVYYCNAEIVVLGVVWTRARTGNYWGQGTQVTVSS
CXCR2001 4	97A9-35GS- 2B2  서열 47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNA EIVVLGVVWTRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSSG GGGGSGGGSEVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQ APGKQRELVRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNLSK PEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
CXCR2001 5	2B2-35GS- 137B7  서열 48	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNLSKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSSG GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGW TRQGP GKAREWVAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNKNTIYLHMDML KPEDTAVYYCASGKYRGGTQVTVSS
CXCR2001 6	137B7-35GS- 2B2  서열 49	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGP GKAREW VAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYCA SGKYRGGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSEVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAP GKQRELVRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNLSK PEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
CXCR2001 7	97A9-35GS- 137B7  서열 50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNA EIVVLGVVWTRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSSG GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGW TRQGP GKAREWVAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNKNTIYLHMDML KPEDTAVYYCASGKYRGGTQVTVSS
CXCR2001 8	137B7-35GS- 97A9  서열 51	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGP GKAREW VAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYCA SGKYRGGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTP GKQRELVADITSGGNINIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSK PEDTAVYYCNAEIVVLGVVWTRARTGNYWGQGTQVTVSS
CXCR2001 9	2B2-9GS-2B2  서열 52	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNLSKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGELVQPGG

[0431]

		LRLSCAASGSILINAMGWYRQAPGKQRELVRRTGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCMLDDRRGGVYWGGGTQVTVSS
<b>CXCR2002-0</b>	<b>127D1-35GS-163D2</b> 서열 53	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFDFKVMGWYRQPPGKQREGVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFFVAAITWNGGRVFTASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2002-1</b>	<b>127D1-35GS-163E3</b> 서열 54	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFDFKVMGWYRQPPGKQREGVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFFVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2002-2</b>	<b>163D2-35GS-163D2</b> 서열 55	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFFVAAITWNGGRVFTASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFFVAAITWNGGRVFTASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2002-3</b>	<b>163D2-35GS-163E3</b> 서열 56	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFFVAAITWNGGRVFTASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFFVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2002-4</b>	<b>163E3-35GS-163E3</b> 서열 57	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFFVAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFFVAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2002-5</b>	<b>163D2-35GS-127D1</b> 서열 58	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFFVAAITWNGGRVFTASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFDFKVMGWYRQPPGKQREGVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2002-6</b>	<b>163E3-35GS-127D1</b> 서열 59	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFFVAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGSEVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFDFKVMGWYRQPPGKQREGVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2002-7</b>	<b>163E3-35GS-163D2</b> 서열 60	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFFVAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFFVAAITWNGGRVFTASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSS
<b>CXCR2002-8</b>	<b>97A9-35GS-54B12</b>	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQRELVADITSGGNINIIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNA

[0432]



표 14

다가 항-CXCR2 나노바디의 리간드 경쟁 분석

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

ND: 결정되지 않음

[0436]

[0437]

19. 제조합 세포주를 사용하는 기능 검정

[0438]

(1) 세포내 칼슘의 효능제 유도된 방출 측정 (FLIPR)

[0439]

인간 또는 시노물구스 CXCR2 수용체를 발현하는 RBL 세포를 96-웰 플레이트에 접종하고, 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 실험 당일에, 세포에 Fluo-4 염료를 30분 동안 37°C에서 로딩한 후, 정제된 다가 항-CXCR2 나노바디와 함께 30분 인큐베이션하였다. 최종적으로, GRO- $\alpha$ 의 첨가를 형광측정 영상화 플레이트 판독기 (FLIPR)를 이용하여 수행한 후, 세포내 칼슘의 방출에 대응하는 형광 신호를 검출하였다. 선택성 검정은 효능제로서 IL-8을 사용하여 인간 CXCR1을 발현하는 L2071 세포를 사용하여 수행하고, 효능제로서 SDF-1을 사용하여 인간 CXCR4를 내인성으로 발현하는 CEM 세포를 사용하여 수행하였지만, 검정 프로토콜은 CXCR2에 대해 기재된 것과 동일하게 유지되었다. 평균 IC<sub>50</sub> 값의 요약을 표 15에 추가로 제시하고, 시험한 어떠한 나노바디도 시험된 농도 (1  $\mu$ M 최대 농도)의 CXCR1 또는 CXCR4에서 세포내 칼슘의 효능제 유도된 방출의 임의의 억제를 보이지 않았다.

[0440]

(2) [<sup>35</sup>S]GTP  $\gamma$ S의 효능제 자극된 축적의 측정

[0441]

정제된 다가 항-CXCR2 나노바디를 96-웰 플레이트에서 효능제 (GRO- $\alpha$ , IL-8 또는 ENA-78) GDP, SPA 비드, 및 인간 CXCR2 수용체를 발현하는 CHO 세포로부터 제조된 CHO-CXC2 막과 60분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, [<sup>35</sup>S]GTP  $\gamma$ S를 첨가하고 추가로 60분 인큐베이션하였다. 최종적으로, 플레이트를 원심분리한 후 탑카운트 상에서 판독하였다. 평균 IC<sub>50</sub> 값의 요약을 표 15에 제시한다.

표 15

제조합 세포주를 사용하는 세포내 칼슘의 방출을 측정하는 기능적 검증에서 정제된 다가 항-CXCR2 나노바디에 대한 IC<sub>50</sub> 값

		인간 CXCR2		시노플구스 CXCR2	
		IC <sub>50</sub> (M)	최대 억제 %	IC <sub>50</sub> (M)	최대 억제 %
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

\* 시험된 농도에서 정제기가 수득되지 않은 경우에 곡선을 100% 억제에 고정시킴. ND - 결정되지 않음.

[0442]

표 16

인간 CHO-CXCR2 세포 막에서 [<sup>35</sup>S]GTPγS의 축적을 측정하는 기능적 검정에서 정제된 다가 항-CXCR2 나노바디에 대한 IC<sub>50</sub> 값

		인간 CXCR2 (상이한 효능제 사용)					
		GRO-α		IL-8		ENA-78	
		IC <sub>50</sub> (M)	최대 억제 %	IC <sub>50</sub> (M)	최대 억제 %	IC <sub>50</sub> (M)	최대 억제 %
CXCR20014	97A9-35GS-2B2	1.38E-9	100	1.13E-9	100	1.66E-9	100
CXCR20020	127D1-35GS-163D2	6.34E-10	100	6.19E-10	100	7.07E-10	100
CXCR20021	127D1-35GS-163E3	5.51E-10	100	8.27E-10	100	7.87E-10	100
CXCR20022	163D2-35GS-163D2	2.85E-8	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20023	163D2-35GS-163E3	2.66E-8	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20024	163E3-35GS-163E3	3.03E-8	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20025	163D2-35GS-127D1	8.91E-10	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20026	163E3-35GS-127D1	8.09E-10	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20028	97A9-35GS-54B12	1.38E-9	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20030	163D2-35GS-54B12	1.02E-9	100	1.09E-9	100	1.30E-9	100
CXCR20031	2B2-35GS-163E3	ND	ND	8.40E-10	100	1.38E-9	100
CXCR20032	2B2-35GS-163D2	ND	ND	9.97E-10	100	1.16E-10	100
CXCR20033	163E3-35GS-2B2	1.01E-9	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20034	163D2-35GS-2B2	9.95E-10	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20035	54B12-35GS-163E3	8.44E-10	100	7.17E-10	100	1.17E-9	100

ND - 결정되지 않음

[0443]

[0444] (3) 항-CXCR2 나노바디의 작용 메커니즘을 결정하기 위한 쉴드(Schild) 분석

[0445] IL-8 및 GRO-α 자극된 [<sup>35</sup>S]GTPγS 축적 검정을 이용하여 쉴드 분석을 수행하였다. 이러한 검정 포맷은 [<sup>35</sup>S]GTPγS의 첨가 전에 효능제 및 나노바디의 평형을 허용하였고, 그 결과로서, 메커니즘의 잘못된 해석으로 이어질 수 있는 반-평형의 임의의 인공물이 방지되어야 한다. 이를 위해, 증가하는 농도의 나노바디의 존재 하에 효능제 농도 반응 곡선을 결정하였다. 2개의 1가 나노바디 54B12 및 163E3에 대한 데이터 및 생성되는 다가 나노바디를 예로서 제시하고, 도 1에 제시한다. 데이터는 GRO-α에 대한 농도 반응 곡선을 보여주지만, IL-8을 사용한 경우에 유사한 데이터가 관찰되었다.

[0446] 1가 나노바디 54B12 및 163E3은 둘 다 알로스테릭 작용 메커니즘을 보이지만, 효능제의 억제에 대해 차별적 효과를 갖는다. 54B12 및 다른 1-19 결합체의 알로스테릭 메커니즘은 증가하는 농도의 나노바디의 존재 하에 추가로 우측으로 이동하지 않는 낮은 나노바디 농도에서 효능제 농도 반응 곡선의 평행 우측 이동에 의해 예시된다 (도 1a). 최대 효능제 반응의 감소를 보이지 않으면서 상기 효과의 포화가능 특성은 효능제의 친화도에 대한 알로스테릭 효과를 표시한다. 이와 대조적으로, 163E3 및 다른 비 1-19 결합체의 알로스테릭 메커니즘은 보다 높은 나노바디 농도에서 최대치 효능제 반응의 감소와 조합되어 효능제 농도 반응 곡선의 평행 우측 이동에 의해 예시된다 (도 1b). 이러한 효과는 포화가능하나 사용된 농도에서는 관찰되지 않았지만, 여기서 핵심 관찰은 효능제의 효능에 대한 알로스테릭 효과를 표시하는 최대 효능제 반응의 감소이다. 최종적으로, 이중파라토프성 나노바디 54B12-163E3은 훨씬 더 낮은 나노바디 농도에서의 평행 우측 이동 및 최대 효능제 반응의 유의한 감소에 의해 예시되는 효능제 농도 반응 곡선에 대한 효과를 생성하기 위해 양쪽 알로스테릭 메커니즘을 조합한다 (도 1c). 이중파라토프성 나노바디 127D1-163E3, 127D1-163D2 및 54B12-163D2를 또한 시험하였으며, 유사한 특성을 갖는 것으로 밝혀졌다 (데이터는 제시되지 않음).

[0447] 도 1에 도시된 바와 같은 동일한 특성은 또한 도 2에 제시되고, 이는 - GRO-α를 억제하는 능력에 대해 시험된 경우에 - 대표적인 결합 분자 127D1이 강력하지만 효과적이지는 않은 반면, 또 다른 결합 분자 163E3은 보다 낮은 효력을 가졌으나 127D1보다는 효과적이라는 것을 보여준다. 2개의 결합 분자를 합한 경우에, 생성된 이중파라토프성 분자는 강력하며 효과적인 것으로 밝혀졌다. 결론적으로, 본 발명의 이중파라토프성 분자는 단량체

나노바디보다 효능 및 효력의 관점에서 보다 우수한 특성을 갖는 것으로 밝혀졌다. IC50 값은 하기 표에 도시된다.

나노바디	특정 농도 (nM)의 GRO $\alpha$ 에서의 IC50 (M)			
	5	15	45	150
<b>127D1</b>	1.642E-09	2.045E-09	3.264E-09	4.602E-09
<b>163E3</b>	3.031E-08	4.044E-08	7.543E-08	1.868E-07
<b>163E3-127D1</b>	6.532E-10	1.983E-09	1.614E-08	6.713E-08

[0448]

[0449]

알로스테릭 조절제의 현재 정의는 이것이 효능제 (오르토스테릭 리간드) 결합 부위와 별개의 부위에서 결합하고 오르토스테릭 리간드와 알로스테릭 조절제 둘 다가 수용체에 동시에 결합된다는 것이다. 본 발명자들은 현재 이를 확인하는 데이터를 갖고 있지 않고 이론에 제한되기를 바라지는 않지만, 나노바디 결합 부위가 효능제 결합 부위와 구분되지 않고 결합 부위가 중첩되는 것으로 생각된다. 또한, 효능제 및 나노바디 둘 다가 수용체에 동시에 결합한다는 것을 보여주는 데이터가 이용가능하지 않으나, 월드 분석 데이터는 이들 나노바디가 CXCR2의 알로스테릭 조절제임을 시사한다.

[0450]

20. 기능적 검정 - NSC

[0451]

섹션 15에 기재된 바와 동일한 방법

**표 17**

1차 인간 또는 시노물구스 호중구를 사용하는 기능적 검정에서 정제된 이중파라토프 항-CXCR2 나노바디에 대한 IC<sub>50</sub> 값 (vs rhGRO $\alpha$ , 평균  $\pm$  SD)

	인간 WBSC IC50 (nM)	시노물구스 WBSC IC50 (nM)	인간 화학주성 IC50 (nM)
<b>97A9-2B2</b>	0.445 $\pm$ 0.08	0.16 $\pm$ 0.16	0.16 $\pm$ 0
<b>163D2-2B2</b>	0.29 $\pm$ 0.17	0.44 $\pm$ 0.14	0.143 $\pm$ 0.003
<b>163E3-2B2</b>	0.345 $\pm$ 0.15	0.42 $\pm$ 0.12	0.15 $\pm$ 0.02
<b>127D1-163D2</b>	0.17	0.12 $\pm$ 0.09	0.143 $\pm$ 0.009
<b>163E3-127D1</b>	0.165 $\pm$ 0.06	0.26 $\pm$ 0.25	0.14 $\pm$ 0.006
<b>97A9-54B12</b>	0.43 $\pm$ 0.18	1.72 $\pm$ 0.43	ND
<b>163D2-54B12</b>	0.215 $\pm$ 0.02	0.56 $\pm$ 0.46	ND
<b>54B12-163E3</b>	0.24 $\pm$ 0.155	0.43 $\pm$ 0.38	ND

[0452]

표 18

143B03	서열 192	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG                  GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTC                  AGTACCTACTGGATGATTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGG                  GCTCGACTGGGTCTCAGCTATTAATGCTGGTGGTATAGCACAT                  ACTATGCAGACCCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC                  AACAAACAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAACC                  TGAGGACACGGCCCTGTATTACTGTGCGACCGTACGAGGCACA                  GCTCGTACTTGGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCG                  TCTCCTCA</p>
139D05	서열 193	<p>GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG                  GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCACTCTCTGGAAGGATCGGC                  AGTATCAACGCCATGGGCTGGTATCGCCAGGTTTCAGGACAACA                  GCGCGAGTTGGTCGCAGTAAGCAGGAGCGGAGGTAGCACAGAC                  ATTGCTGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAA                  CGGCAAGAACACAGTGTATCTGCAGATGGACAGCCTGAAACCTG                  AGGACACGGCCGTCTATTACTGTTATGCTCATACTTCAAGTATA                  GTAATTGGCGAGTCTACAATAACGACTACTGGGGCCAGGGGACC                  CAGGTCACCGTCTCCTCA</p>
146A06	서열 194	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG                  GGGGTCTCTGAGACTTACCTGTGCAGCCTCTGGACGCATCGG                  CACTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAG                  CAGCGCGAGTTGGTCGCAGTATTACTAGTGGTGGTAGGATAGA                  CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA                  ATGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCT                  GAGGACACGGCCGTCTATTACTATAATGTAGAAACGGTAGTGGG                  TGCCGTCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA</p>

[0453]

147A01	서열 195	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG                  GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGGATGGG                  CAATATCAATGCCATGGGCTGGTATCGCCAGGCTCCAGGGAAAG                  AGCGCGAGTTGGTCGCAAAAATTACTAGGGTGGTGCATAACC                  TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATGCCAGAGACAA                  TATTCTGAACACGGCGTATCTGCAAATGAACGACCTGAAACCTGA                  GGACACGGCCGTCTATTATTAATAGTAGATGGGGGGCCAGTC                  AAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA</p>
145C09	서열 196	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG                  GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACITTC                  GATGATTATGCCATAGGCTGGTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGG                  AGCGTGAGAGGGTCATATGATTAGTGGTAGTGATGGTAGCACA                  TACTATGCAGACTCCGTCAAGGGCCGATTACCATCTCCAGTGA                  CAACGCCAAGAACACGGGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAAC                  CCGAGGACACGGCCGTTTATTATTGTGCAGCATATTGGGACTA                  ACGCTCAGGCTATGGATGCCCCCCACCGGTATGACTACTGGG                  GCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA</p>
145D03	서열 197	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG                  GGGGGTCTCTGAGCCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTTATCTTC                  AGACTCAGTGGCATGGCCTGGTATCGCCAGGCTCCGGGGAGGC                  AGCGCGAGTGGTCCGAGTCTTACCAAAGATGGTACCTACAC                  CTATGCAGACCCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAAACAA                  CGCCGAGAACACGTGGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG                  AGGACACAGCCATCTATTACTGTAATACGGGCCGTTACTGGGGC                  CAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA</p>
144D01	서열 198	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG                  GGGGGTCACTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAACCATCGG                  CACGATCAGAGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAG                  CAGCGGAGTTGGTCGCATTGATTACTAGTACTGGTAGGATAAA                  CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATTGGAAGAGACA                  ATGCCAAGAACACGGCGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAACCT                  GAGGACACGGCCGTCTATTACTATAATCGAAACACTACGACGT                  AACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA</p>
139H02	서열 199	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTG                  GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTT                  AGTAACTATGCCATGGGCTGGTCCGCCAGGCCACAGGGAAGG                  AGCGTGAGTTGTAGCAGCTATTAACAAGAGTGGTGGGAACACA                  CACTATGCAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA                  CAACGCCAAGAACACGGGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC                  CTAGGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCGTCGCGGACTAAC</p>

[0454]

		CCTAAGCCTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
139A08	서열 200	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCTCCTTCAGTGCAGTGCCATGGGCTGGCTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAATTTGTAGCAGGTATTAGCTGGGGTGGTGATAACTCA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACCGTGTCTTACAATGAACAGCCTGAAACCTCAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAAGATACCGGGGAGGCGCGGCAGTAGCTGGTTGGGAGTACTGGGGCCAGGGGACCAGGTCACCGTCTCCTCA
137A08	서열 201	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACTTTGCGCTATTATACCGTAGGCTGGTTCGCCGGGCCCCAGGGAAGGAGCGCAGGGGATCTCATGTATTAGTAGTAGTGATGGTAGCACA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAATACGGTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGGCTGACAGACGTACCGACTGTAAAAAGGTTAGAGTCTGGTTCCTGGGGCCAGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
143A05	서열 202	AAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGGCTGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGACGCGCCTTCAATTACTATGTCATGGCCTGGTTCGCCAGGCTCAAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTAGCACGCGTGGTAGTATGACAAAGTATTCAGACTCCGTGCAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACCGTGTATCTGCACATGAACAGCCTGAAACCTGAGGATACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAGCCCTCGCGGCAGTAGCTGGTCATTTTCGTCGGGGGTTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
137B07	서열 203	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGTCTGTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGAATCATCTTCAGACTCAGTGCCTGGGTTGGACACGCCAGGTCAGGAAAGGCGCGCAGTGGGTCGCAGGTATTAACAGTGATGGTACGACCAA CTACGCCGACCCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGATATATCTGCACATGGACATGCTGAAACCTGAGGATACGGCCGCTATTACTGTGCCTCCGGAAAGTACCGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
127D01	서열 204	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGAGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCACCTTCGATTTCAAAGTCATGGCTGGTACCGCCAGCCTCCAGGGAAGCACGCGAGGGGGTTCGCAGCGATTAGGCTTAGTGGAACATGCAC

[0455]

		TATGCAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAAAGCCAA CGCCAAGAACACAGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTG AGGACACGGCCGTCTATTACTGTAAGGTGAACATTCCGGGGCCAG GACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
126B11	서열 205	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGTCTCTGACGCTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAAGCTCCTTC AGAATCAATACCATGGGCTGGTACCGCCGGGCTCCAGGGAAGC AGCGCGAGTTGGTGCAGCTCGTATAGAGGTGGTTACATAAAC TATGTAGATTCCGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAA CGCCAAGCCACAATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG AGGACACGGCCGTCTATTATTGTCATGCCGGGACCCAAGATCGG ACGGGTCCGAATTCGACCACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCA CCGTCTCCTCA
097A09	서열 206	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGAAGCATCGTC AGAATTAATACCATGGGCTGGTACCGCCAGACTCCAGGGAAGCA GCGCGAGTTGGTGCAGATATTACCAGTGGTGAACATAAACT ATATAGACGCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAA ACCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGA GGACACGGCCGTCTATTACTGTAATGCAGAGATCGTTGTTCTGG TGGGAGTTTGGACCCAGCGTGCAGGACCCGCAACTACTGGGG CCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
159B10	서열 207	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCCTG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACGTTT AGTAGCTTGTCCATGGGCTGGTCCCGCCAGGCTCCGGGAAGG AGCGTGCCTTTGTAGCAGCGCTTACTCGAAATGGTGGTTACAGA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CGTCGCCAAGAAGACCTTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCAGATAGTCTTAGT GGTAGTACTACTTAGGAACCAACCTAGACTACTGGGGCCAGGG GACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
163D02	서열 208	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTC AGTGACTATGCCATGGGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG AGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTACGTGGAATGGTGGTAGAGTA TTTTACTGCCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CAACGCCAAGAACAGATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAGATAAAGACAGA CGTACTGACTATCTAGGGCACCCGTTGCCTACTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
163E03	서열 209	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCCTG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGACGCATCTTC

[0456]

		<p>AGTAGCAATGCCATGGGCTGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGG                  AGCGTGAGTTTGTAGCGGCCATTACCTGGAGGAGTGCGGGTAG                  CGCGTACTATGCAGACTCCGCGAAGGGCCGATTACCATCTCCA                  GAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATTTGCAAATGAACAGCCTG                  AAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTATTGTGCAGCTGGTGGTAG                  TTCCTGGTTAAGTTTTCCGCCGGACTACTGGGGCCAGGGGACCC                  AGGTCACCGTCTCCTCA</p>
2B2	서열 210	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGAGTTGGTGCAGCCG                  GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTT                  AACTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAG                  CAGCGGAGTTGGTAGTCCGTAGGACTAGGGGTGGTAGACAA                  CGTATCAAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCGCAGAC                  ATTGCCAAGAAAACGATGTATCTCCAAATGAACAGCCTGAAACCT                  GAAGACACGGCCGTCTATTACTGTATGCTAGATGACCGTGGGGG                  TGCTACTGGGGTCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA</p>
54B12	서열 211	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG                  GGGGGTCTCTGACGCTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAAGCACCTTC                  AGAATCAATACCATGGGCTGGTACCGCCGGGCTCCAGGGAAGC                  AGCGCGAGTTGGTCGCAGCTCGTGATAGAGGTGGTTACATAAAC                  TATGTAGATTCCGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAA                  CGCCAAGCCACAATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG                  AGGACACGGCCGTCTATTATTGTATGCCGGGACCCAAGATCGG                  ACGGGTCGGAAATTCGACCGCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCA                  CCGTCTCCTCA</p>

[0457]

[0458]

리드패널-CDR+FR CXCR2 카바트

19 頁

	프레임워크 1	CDR1	프레임워크 2	CDR2	프레임워크 3	CDR3	프레임워크 4
143B03	EVQLVESGGGLVQPGGSILRLS CAASGPTFS 시월 70	TYWNY 시월 132	WFRQAPRGIDWV S 시월 91	AINKGDSITYADPV KG 시월 152	RFTISDNANKNTVYLQMSLK PEDTALYYCAT 시월 111	VKGTARLDLY 시월 172	WGQGTQVTVSS 시월 131
139D05	EVKLVESGGGLVQKGSILRLS CALSGRLGS 시월 71	INAMG 시월 133	WFRQVSGQRELV A 시월 92	VRSFGSSTDIADSVK G 시월 153	RFTISDNKAKNTVYLLQMSLK PEDTAVYYCYA 시월 112	HNSYSNWRVYNNDY 시월 173	WGQGTQVTVSS 시월 131
145C09	EVQLVESGGGLVQAGGSILRLS CAASGPTFD 시월 72	DVALG 시월 134	WFRQAPGREERV S 시월 93	CISGSDSITYADSV KG 시월 154	RFTISSDNKAKNTVYLLQMSLK PEDTAVYYCAA 시월 113	YVGLTLRLMMPPHRYDY 시월 174	WGQGTQVTVSS 시월 131
145D03	EVQLVESGGGLVQAGGSILRLS CAASGLIFR 시월 73	LSGMA 시월 135	WFRQAPGREEMV A 시월 94	VLTNDGTLHYADPVK G 시월 155	RFTISSNVAENTVYLLQMSLK PEDTALYYCNP 시월 114	GRV 시월 175	WGQGTQVTVSS 시월 131
139H02	EVQLVESGGGLVQAGGSILRLS CAASGRTFS 시월 74	INPAMG 시월 136	WFRQATGKEREFV A 시월 95	AINKSGQNTHYAGSV KG 시월 156	RFTISSDNKAKNTVYLLQMSLK PRDTAVYYCAA 시월 115	SRTNKPQVY 시월 176	WGQGTQVTVSS 시월 131
139A08	EVQLVESGGGLVQAGGSILRLS CAASGRSFS 시월 75	RSAMG 시월 137	WFRQAPGREBEFV A 시월 96	CISWGQNSTYADSV KG 시월 157	RFTISSDNKAKNTVYLLQMSLK EODTAVYYCAA 시월 116	RVRGGAAVAGMEY 시월 177	WGQGTQVTVSS 시월 131
137A08	EVQLVESGGGLVQPGGSILRLS CAASGSTLA 시월 76	YYTVG 시월 138	WFRQAPGREBEI S 시월 97	CISSDSSTYADSV KG 시월 158	RFTISSDNKAKNTVYLLQMSLK PEDTAVYYCAA 시월 117	DRRDCKKGRVSGGS 시월 178	WGQGTQVTVSS 시월 131
143A05	KVQLVESGGGLVQKGSILRLS CAASGRAPN 시월 77	YVYMA 시월 139	WFRQAKGREBEFV A 시월 98	A1STRGSMTRYADSV OG 시월 159	RFTISSDNKAKNTVYLLQMSLK PEDTAVYYCAA 시월 118	DRGSSWSPSSGGYDY 시월 179	WGQGTQVTVSS 시월 131
137B07	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLS CVASGLIFR 시월 78	LSALG 시월 140	WFRQAPGRABWV A 시월 99	GINSIDGTTNVDPVK G 시월 160	RFTISSDNKAKNTVYLLQMSLK PEDTAVYYCAS 시월 119	GRV 시월 180	WGQGTQVTVSS 시월 132
127D01	EVQLVESGGGLVQAGESELRLS CAASGPTFD 시월 79	FVYWG 시월 141	WFRQPPKOREEV A 시월 100	A1RLSGNMHYAESVK G 시월 161	RFTISSNANKNTVYLLQMSLK PEDTAVYYCKV 시월 120	NIRGQDY 시월 181	WGQGTQVTVSS 시월 131
126B11	EVQLVESGGGLVQAGGSILRLS CAVSSGSPR 시월 80	INWNG 시월 142	WFRRAPKORELV A 시월 101	RADRSGYINVDVSK G 시월 162	RFTVSDNANKPTMVLQMSLK PEDTAVYYCCHA 시월 121	GRQDRGRANPDH 시월 182	WGQGTQVTVSS 시월 131
097A09	EVQLVESGGGLVQPGGSILRLS	INTWG	WFRQPPKORELV	DTSQGINVIIDAVK	RFTISSNDTKNTVYLLQMSLK	EIVVIVGVWPTQPARFGNV	WGQGTQVTVSS

	CYASGSIVR 시열 81	시열 143	A 시열 102	G 시열 163	PEDTAVVYCCNA 시열 122	시열 183	시열 133
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRFFS 시열 82	SLSMG 시열 144	WFRQAPGKERAFV A 시열 103	ALTRNGGYYVYADSV KG 시열 164	RFTTISRVAARKTLVLOMNSLAK PEDTAVVYCCNA 시열 123	DSLSSSDYLGFTNLDY 시열 184	WGQGTQVTVVSS 시열 131
163D02	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRFFS 시열 83	DYAMG 시열 145	WFRQAPGKEREFV A 시열 104	ALTRNGGKRVFTTASV KG 시열 165	RFTTISRMAKNTVYLQOMNSLAK PEDTAVVYCCNA 시열 124	DKDRFTDYLGHPVAV 시열 185	WGQGTQVTVVSS 시열 131
163E03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRFFS 시열 84	SNMAMG 시열 146	WFRQAPGKEREFV A 시열 105	ALTRNGGSAVYVADS AKG 시열 166	RFTTISRMAKNTVYLQOMNSLAK PEDTAVVYCCNA 시열 125	GGSSSWLSPPPDY 시열 186	WGQGTQVTVVSS 시열 131
002B02	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGSILT 시열 85	INMAMG 시열 147	WFRQAPGKEREFV V 시열 106	RRTTRGGSTTYDQSVK G 시열 167	RFTTISADTARKTWTYLQOMNSLAK PEDTAVVYCCNA 시열 126	DDRQGVY 시열 187	WGQGTQVTVVSS 시열 131
146A06	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRIGT 시열 86	INMAMG 시열 148	WFRQAPGKEREFV A 시열 107	VITSGGRITVADSVK G 시열 168	RFTTISRMAKNTVYLQOMNSLAK PEDTAVVYCCNA 시열 127	ETVVGAVY 시열 188	WGQGTQVTVVSS 시열 131
147A01	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRMKN 시열 87	INMAMG 시열 149	WFRQAPGKEREFV A 시열 108	KITRGGALTYADSVK G 시열 169	RFTTISRMAKNTVYLQOMNSLAK PEDTAVVYCCNA 시열 128	DGGPSONY 시열 189	WGQGTQVTVVSS 시열 131
144D01	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTIGT 시열 88	TRAMG 시열 150	WFRQAPGKEREFV A 시열 109	LITSTGRITVADSVK G 시열 170	RFTTISRMAKNTVYLQOMNSLAK PEDTAVVYCCNA 시열 129	ETLRRNY 시열 190	WGQGTQVTVVSS 시열 131
054B12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAVSSGTPFR 시열 89	INTMIG 시열 151	WFRQAPGKEREFV A 시열 110	ARDGGGYIVVYDQSVK G 시열 171	RFTTISRMAKNTVYLQOMNSLAK PEDTAVVYCCNA 시열 130	GTQDRGRNRFDK 시열 191	WGQGTQVTVVSS 시열 131

[0460]

[0461]

21. 시열 최적화 - CXCR2 길항제 폴리펩티드

[0462]

열 이동 검정 (TSA): 5 µl의 정제된 1가 나노바디 (80mg/ml)를 10 µl의 완충제 (100mM 포스페이트, 100mM 보레이트, 100mM 시트레이트, 115mM NaCl, 3.5 내지 9 범위의 상이한 pH에서 완충됨) 내의 5 µl의 형광 프로브 시프로 오렌지 (Sypro Orange) (인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드, 카탈로그 번호 S6551) (최종 농도 10x)와 혼합하였다. 이어서, 샘플을 라이트사이클러(LightCycler) 480II 기기 (로슈, 스위스 바젤)에서 4.4°C/s로 37로부터 90°C로 가열한 후, 2.2°C/s로 37°C로 냉각하였다. 열-유도된 비폴딩 후에, 단백질의 소수성 패치는 노출되고, 시프로 오렌지가 여기에 결합하여 형광 강도를 증가시킨다. 형광 강도 곡선의 1차 미분의 변곡점이 용융 온도 (Tm)의 척도로서 역할을 한다. (문헌 [Ericsson et al. 2006 (Annals of Biochemistry, 357: 289-298)]).

[0463]

시차 주사 열량측정법 (DSC): 실험은 제조업체의 지침에 따라 Auto-Cap VP-DSC (마이크로칼(MicroCal) - 지이 헬스케어(GE Healthcare)) 상에서 수행하였다. 나노바디 (0.25mg/mL)의 용융 온도 결정은 30°C 내지 95°C의 온도 범위에 걸쳐 1°C/분의 가열 속도로 수행하였다. 최종 온도기록도는 적절한 기준선 공제 후에 얻었다. 소프

트웨어-유도된 (오리진(Origin) 7.0) 피크 검출을 통해 상응하는 용융 온도를 얻었다.

[0464] 강제 산화: 나노바디 샘플 (1mg/mL)을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 없는 대조군 샘플과 병행하여 PBS 내의 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 RT에서 및 암실 내에서 4시간 동안 적용한 후, Zeba 탈염 스피ن 칼럼 (0.5mL) (써모 사이언티픽 (Thermo Scientific))을 사용하여 완충제를 PBS로 전환하였다. 이어서, 스트레스를 가한 및 대조군 샘플을 70°C에서 조르박스(Zorbax) 300SB-C3 칼럼 (애질런트 테크놀로지스 (Agilent Technologies)) 상에서 시리즈 (Series) 1200 기기 (애질런트 테크놀로지스)로 RPC에 의해 분석하였다. 나노바디의 산화는 주요 단백질 피크에 비해 산화 스트레스의 결과로 발생하는 예비-피크의 피크 면적%의 결정에 의해 정량화하였다.

[0465] 2B2 서열 최적화

[0466] 모 2B2의 단백질 서열을 인간 VH3-23 (DP-47) 및 JH5 배선에 정렬하였다 (표 20, 147 페이지). 인간 배선 서열에 대한 아미노산 차이는 문자로, 동일한 아미노산은 점으로 표시하였다. 밑줄로 나타낸 아미노산 차이를 인간 대응물로의 전환을 위해 선택하였고, 다른 것은 그대로 두었다.

[0467] 정제된 1가 물질을 2B2, CXCR20059 및 CXCR20063으로부터 생산하였고, 이어서 FACS 리간드 경쟁 검정 및 인간 및 시노물구스 CXCR2 둘 다에 대한 세포내 칼슘의 효능제-유도된 방출 (FLIPR) 검정에서 그의 특성을 결정하였다. 또한, 변이체의 용융 온도는 열 이동 검정 (TSA) 또는 시차 주사 열량 측정 (DSC)에 의해 결정하였다 (표 21). CXCR20059 및 CXCR20063 내의 M93L 돌연변이는 강제 산화에 대한 모 2B2의 감수성을 제거한다.

**표 21**

1가 2B2 및 서열-최적화 변이체의 기능적 특성화

	T <sub>m</sub> (°C)	FACS hGro-α 경쟁 IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
<b>2B2</b>	73.7	1.3 X 10 <sup>-09</sup>	3.5 X 10 <sup>-08</sup>	6.5 X 10 <sup>-07</sup>	2.4 X 10 <sup>-05</sup>
<b>CXCR20059</b>	73.4	1.5 X 10 <sup>-09</sup>	1.9 X 10 <sup>-08</sup>	3.9 X 10 <sup>-07</sup>	1.9 X 10 <sup>-05</sup>
<b>CXCR20063</b>	71.9	nd	5.4 X 10 <sup>-08</sup>	6.1 X 10 <sup>-06</sup>	2.4 X 10 <sup>-05</sup>

[0468]

[0469] 97A9 서열 최적화

[0470] 모 97A9의 단백질 서열을 인간 VH3-23 (DP-47) 및 JH5 배선에 정렬하였다 (표 22, 147 페이지). 인간 배선 서열에 대한 아미노산 차이는 문자로, 동일한 아미노산은 점으로 표시하였다. 밑줄로 나타낸 아미노산 차이를 인간 대응물로의 전환을 위해 선택하였고, 다른 것은 그대로 두었다.

[0471] 정제된 1가 물질을 97A9 및 CXCR20061로부터 생산하였고, 이어서 FACS 리간드 경쟁 검정 및 인간 및 시노물구스 CXCR2 둘 다에 대한 세포내 칼슘의 효능제-유도된 방출 (FLIPR) 검정에서 그의 특성을 결정하였다. 또한, 변이체의 용융 온도는 열 이동 검정 (TSA)으로 결정하였다 (표 23).

**표 23**

1가 97A9 및 서열-최적화 변이체의 기능적 특성화

ID	T <sub>m</sub> (°C)	FACS hGro-α 경쟁 IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
		hCXCR2 ctrl	cCXCR2 ctrl	hCXCR2	cCXCR2
<b>97A9</b>	76.5	1.2 X 10 <sup>-08</sup>	6.3 X 10 <sup>-08</sup>	9.4 X 10 <sup>-08</sup>	8.0 X 10 <sup>-07</sup>
<b>CXCR20061</b>	80.2	1.5 X 10 <sup>-08</sup>	6.2 X 10 <sup>-08</sup>	6.6 X 10 <sup>-08</sup>	3.5 X 10 <sup>-07</sup>

[0472]

[0473] 163E3 서열 최적화

[0474] 모 163E3의 단백질 서열을 인간 VH3-23 (DP-47) 및 JH5 배선에 정렬하였다 (표 24, 147 페이지). 인간 배선 서열에 대한 아미노산 차이는 문자로, 동일한 아미노산은 점으로 표시하였다. 밑줄로 나타낸 아미노산 차이를

인간 대응물로의 전환을 위해 선택하였고, 다른 것은 그대로 두었다.

[0475] 정제된 1가 물질을 163E3 및 CXCR20076으로부터 생산하였고, 이어서 FACS 리간드 경쟁 검정 및 인간 및 시노물구스 CXCR2 둘 다에 대한 세포내 칼슘의 효능제-유도된 방출 (FLIPR) 검정에서 그의 특성을 결정하였다. 또한, 변이체의 용융 온도는 열 이동 검정 (TSA)으로 결정하였다 (표 25).

**표 25**

1가 163E3 및 서열-최적화 변이체의 기능적 특성화

	Tm (°C)	FACS hGro-α 경쟁 IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
<b>163E3</b>	74.4	1.0 X 10 <sup>-08</sup>	2.2 X 10 <sup>-08</sup>	3.5 X 10 <sup>-08</sup>	1.5 X 10 <sup>-07</sup>
<b>CXCR20076</b>	77.3	1.6 X 10 <sup>-08</sup>	2.5 X 10 <sup>-08</sup>	3.1 X 10 <sup>-08</sup>	1.0 X 10 <sup>-07</sup>

[0476]

[0477] 127D1 서열 최적화

[0478] 모 127D1의 단백질 서열을 인간 VH3-23 (DP-47) 및 JH5 배선에 정렬하였다 (표 26, 147 페이지). 인간 배선 서열에 대한 아미노산 차이는 문자로, 동일한 아미노산은 점으로 표시하였다. 밑줄로 나타낸 아미노산 차이를 인간 대응물로의 전환을 위해 선택하였고, 다른 것은 그대로 두었다.

[0479] 정제된 1가 물질을 127D1 및 CXCR20079로부터 생산하였고, 이어서 FACS 리간드 경쟁 검정 및 인간 및 시노물구스 CXCR2 둘 다에 대한 세포내 칼슘의 효능제-유도된 방출 (FLIPR) 검정에서 그의 특성을 결정하였다. 또한, 변이체의 용융 온도는 열 이동 검정 (TSA)으로 결정하였다 (표 27). CXCR20079 내의 M57R 돌연변이는 강제 산화에 대한 모 127D1의 감수성을 제거한다.

**표 27**

1가 127D1 및 서열-최적화 변이체의 기능적 특성화

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

[0480]

[0481] 163D2 서열 최적화

[0482] 모 163D2의 단백질 서열을 인간 VH3-23 (DP-47) 및 JH5 배선에 정렬하였다 (표 28, 148 페이지). 인간 배선 서열에 대한 아미노산 차이는 문자로, 동일한 아미노산은 점으로 표시하였다. 밑줄로 나타낸 아미노산 차이를 인간 대응물로의 전환을 위해 선택하였고, 다른 것은 그대로 두었다.

[0483] 정제된 1가 물질을 163D2 및 CXCR20086으로부터 생산하였고, 이어서 FACS 리간드 경쟁 검정 및 인간 및 시노물구스 CXCR2 둘 다에 대한 세포내 칼슘의 효능제-유도된 방출 (FLIPR) 검정에서 그의 특성을 결정하였다. 또한, 변이체의 용융 온도는 열 이동 검정 (TSA)으로 결정하였다 (표 29).

표 29

1가 163D2 및 서열-최적화 변이체의 기능적 특성화

	Tm (°C)	FACS hGro-α 경쟁 IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
		hCXCR2	eCXCR2	hCXCR2	eCXCR2
163D2	70.7	2.8 X 10 <sup>-09</sup>	7.1 X 10 <sup>-09</sup>	6.6 X 10 <sup>-08</sup>	9.2 X 10 <sup>-08</sup>
CXCR20086	72.3	2.0 X 10 <sup>-09</sup>	4.8 X 10 <sup>-09</sup>	7.3 X 10 <sup>-08</sup>	8.5 X 10 <sup>-08</sup>

[0484]

[0485]

54B12 서열 최적화

[0486]

모 54B12의 단백질 서열을 인간 VH3-23 (DP-47) 및 JH5 배선에 정렬하였다 (표 30, 148 페이지). 인간 배선 서열에 대한 아미노산 차이는 문자로, 동일한 아미노산은 점으로 표시하였다. 밑줄로 나타낸 아미노산 차이를 인간 대응물로의 전환을 위해 선택하였고, 다른 것은 그대로 두었다.

[0487]

정제된 1가 물질을 54B12, CXCR20103 및 CXCR2104로부터 생산하였고, 이어서 FACS 리간드 경쟁 검정 및 인간 및 시노몰구스 CXCR2 둘 다에 대한 세포내 칼슘의 효능제-유도된 방출 (FLIPR) 검정에서 그의 특성을 결정하였다. 또한, 변이체의 용융 온도는 열 이동 검정 (TSA)으로 결정하였다 (표 31).

표 31

1가 54B12 및 서열-최적화 변이체의 기능적 특성화

ID	Tm (°C)	FACS hGro-α 경쟁 IC50 (M)		FLIPR hGro-α IC50 (M)	
		hCXCR2 ctrl	eCXCR2 ctrl	hCXCR2	eCXCR2
54B12	64.4	nt*	3.3 X 10 <sup>-08</sup>	1.5 X 10 <sup>-07</sup>	1.1 X 10 <sup>-06</sup>
CXCR20104	tbid	nt*	1.3 X 10 <sup>-08</sup>	5.9 X 10 <sup>-8</sup>	3.5 X 10 <sup>-6</sup>

[0488]

표 20

2B2 및 서열-취적화 변이체의 정렬

카바트 #	10	20	30	40	50	60	70	80	90	101	110
VH3-23/JH5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CXCR2282	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CXCR20059	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CXCR20063	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

VH3-23/JH5 - 서열 312







표 28

163D2 및 시열-취적화 번이체의 정렬

카드#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
VR3-23/375	EVJLPSGSGZVQIPESLJKSSJASGFTFSSFAKSWVROQFEGKAGLWVSHLSSGSSITLJASVYKRETTLSRONSKATLJOMNSIRKAEHTAVYCK							abc		accdeafg	
CXR2163D2	V.....A.....R.....D.....G.....F.....ER.F.A.TMN.NVE.TA.....M.....L.....K.....P.....									ADDKRTDYLSHPAY	WQOSTLVWSS
CXR20086											Q.....

[0493]

표 30

54B12 및 서열-취적화 변이체의 정렬

카세트 #	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
VH3-23/JH5	EVQLLESGGGLVQPGQSLRL	LSAASGFTPESSYAMSWVRO	QAPKGLIEWSAISGSGSTVY	ADSVKGRFTISRDNSKNTL	YLQMNSLKAEADPAVYYCAK	-----	WGQGLIVTYS	.....			
CXCR254B12	V.....A...T...V.S.	RINF.G.Y.R...QR.L.A	RD-R.YIN.V.....V...A	P.M.....KP.....	HAGTODRTRGNFDR	.....Q.....					
CXCR20103	V.....V.S.	RINF.G.Y.....QR.L.A	RD-R.YIN.V.....V...A	P.M.....P.....	HAGTODRTRGNFDR	.....P.....					
CXCR20104	V.....V.S.	RINF.G.Y.....QR.L.A	RD-R.YIN.V.....V...A	P.M.....P.....	HAGTODRTRGNFDR	.....P.....					

서열-취적화 변이체의 아미노산 서열

CXCR20059	EVQLLEGGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIITFINAMGWYRQAPGKQRELIYVRRTRGGSTTYQDYSK GRFTISADISKRTMYLQMNISLRPEDETMAYYYCLLDDRGGYWGGGTLVTVSS	서열 213
CXCR20063	EVQLLEGGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIITFINAMGWYRQAPGKQRELIYVRRTRGGSTTYQDYSK GRFTISADISKRTMYLQMNISLRPEDETMAYYYCLLDDRGGYWGGGTLVTVSS	서열 214
CXCR20061	EVQLLEGGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIRITMGMWYRQAPGKQRELIYVADITSGGININVDYSK GRFTISRDNSKNTVYIQLQMSLRPEDETMAYYCAEIVLVGWITQKARTENYWGQGITLVTVSS	서열 215
CXCR20079	EVQLLEGGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIRPEDETMAYYCKVNIIRGQDYWGQGITLVTVSS GRFTISRANSKNTVYIQLQMSLRPEDETMAYYCKVNIIRGQDYWGQGITLVTVSS	서열 216
CXCR20076	EVQLLEGGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIYSSNAMGWFRQAPGKEREFVAIITWRSGGSAAYYADS YKGRFTISRDNSKNTVYIQLQMSLRPEDETMAYYCAAGSSWLSHPDYWGQGITLVTVSS	서열 217
CXCR20086	EVQLLEGGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIYSDYAMGWFRQAPGKEREFVAITTMGGGRVFTYASV KGRFTISRDNSKNTVYIQLQMSLRPEDETMAYYCAADKRRRTDYLGHPVAVWGGGTLVTVSS	서열 218
CXCR20104	EVQLLEGGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSTFRINTMGMWYRQAPGKQRELIYVARRDRGGYINYYDYSK GRFTISRDNSKPTMYLQMNISLRPEDETMAYYCHAGTQDRTGRNFDRMGGGTLVTVSS	서열 219

표 32

시열좌편 이중바코드포식 아비노산 시열 (A1b8용 갖는 HLR 포항)

CXCR20079-35GS-	시월 221	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTRTPDFKVMGWYRQAPGKOREVVAALIRLIGNRHVAESVKGRRFTISRANSKN TYVLIQMNSLRPEDTAVYYCKVNIHQDYMWGQGTLLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEV QLLESQGGIVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGMFROAPGKEREFVAALITWRSGGSAYYADSVKGRFTISRDN TYVLIQMNSLRPEDTAVYYCAAGSSMILSPDPYMGQGTLLVTVSS
CXCR20079-35GS-	시월 222	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTRTPDFKVMGWYRQAPGKOREVVAALIRLIGNRHVAESVKGRRFTISRANSKN TYVLIQMNSLRPEDTAVYYCKVNIHQDYMWGQGTLLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEV EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRPESDYAMGMFROAPGKEREFVAALITMNGGRVFTYASVYKGRFTISRDN NTYLIQMNSLRPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVAYWGQGTLLVTVSS
CXCR20104-35GS-	시월 223	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTRPRTIMTWGMWYRQAPGKOREVVAALIRLIGNRHVAESVKGRRFTISRDN TYVLIQMNSLRPEDTAVYYCHAGTDRPTGNLPRWQGTLLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEV GGSEVQLLESQGGIVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGMFROAPGKEREFVAALITWRSGGSAYYADSVKGRFTISR DNKNTTYLIQMNSLRPEDTAVYYCAAGSSMILSPDPYMGQGTLLVTVSS
CXCR20104-35GS- CXCR20086	시월 224	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTRPRTIMTWGMWYRQAPGKOREVVAALIRLIGNRHVAESVKGRRFTISRDN TYVLIQMNSLRPEDTAVYYCHAGTDRPTGNLPRWQGTLLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEV GGSEVQLLESQGGIVQPGGSLRLSCAASGRPESDYAMGMFROAPGKEREFVAALITMNGGRVFTYASVYKGRFTISR NSKNTTYLIQMNSLRPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVAYWGQGTLLVTVSS
CXCR20079-35GS- CXCR20076-35GS-A1b8	시월 225	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTRTPDFKVMGWYRQAPGKOREVVAALIRLIGNRHVAESVKGRRFTISRANSKN TYVLIQMNSLRPEDTAVYYCKVNIHQDYMWGQGTLLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEV QLLESQGGIVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGMFROAPGKEREFVAALITWRSGGSAYYADSVKGRFTISRDN TYVLIQMNSLRPEDTAVYYCAAGSSMILSPDPYMGQGTLLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEV GGSEVQLLESQGGIVQPGGSLRLSCAASGSTRPRTIMTWGMWYRQAPGKOREVVAALIRLIGNRHVAESVKGRRFTISR NAKTTTYLIQMNSLRPEDTAVYYCTIIGGSLRSRSGQGTLLVTVSS
CXCR20079-35GS- CXCR20061-35GS-A1b8	시월 226	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTRTPDFKVMGWYRQAPGKOREVVAALIRLIGNRHVAESVKGRRFTISRANSKN TYVLIQMNSLRPEDTAVYYCKVNIHQDYMWGQGTLLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEV EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGMFROAPGKEREFVAALITWRSGGSAYYADSVKGRFTISRDN TYVLIQMNSLRPEDTAVYYCNAEITVIVLWQWQARATGANWQGTLLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEV GGSEVQLLESQGGIVQPGGSLRLSCAASGSTRPRTIMTWGMWYRQAPGKOREVVAALIRLIGNRHVAESVKGRRFTISR FTISRDNKNTTYLIQMNSLRPEDTAVYYCTIIGGSLRSRSGQGTLLVTVSS
CXCR20079-35GS- CXCR20086-35GS-A1b8	시월 227	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTRTPDFKVMGWYRQAPGKOREVVAALIRLIGNRHVAESVKGRRFTISRANSKN TYVLIQMNSLRPEDTAVYYCKVNIHQDYMWGQGTLLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEV EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRPESDYAMGMFROAPGKEREFVAALITMNGGRVFTYASVYKGRFTISRDN TYVLIQMNSLRPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVAYWGQGTLLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEV GGSEVQLLESQGGIVQPGGSLRLSCAASGSTRPRTIMTWGMWYRQAPGKOREVVAALIRLIGNRHVAESVKGRRFTISR KTYVLIQMNSLRPEDTAVYYCTIIGGSLRSRSGQGTLLVTVSS
A1b8	시월 228	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTRPRTIMTWGMWYRQAPGKOREVVAALIRLIGNRHVAESVKGRRFTISRANSKN TYVLIQMNSLRPEDTAVYYCTIIGGSLRSRSGQGTLLVTVSS

[0496]

표 34

CDR (카바드) 및 포데인르크 영역의 주석을 포함한 서열 최적화 변이체 및 모체의 아미노산 서열:

	CDR1	CDR2	CDR3	CDR4
9	서열 229	서열 106	서열 167	서열 187
CXCR2005	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGSIITL 147	WYRQAPKQKRELVV 서열 106	RRTRGGSTVYQDSVKG 서열 167	DDRGGVY 서열 187
3	서열 229	서열 106	서열 167	서열 187
CXCR2006	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGSIITL 147	WYRQAPKQKRELVV 서열 106	RRTRGGSTVYQDSVKG 서열 167	DDRGGVY 서열 187
002802	서열 85	서열 106	서열 167	서열 187
CXCR2007	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGSIITL 147	WYRQAPKQKRELVV 서열 106	RRTRGGSTVYQDSVKG 서열 167	DDRGGVY 서열 187
1	서열 230	서열 234	서열 235	서열 183
CXCR2006	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGSIIVR 143	WYRQAPKQKRELVV 서열 234	DRTRGGNINVAIDVKG 서열 235	EIVVLGVWVWVQRRARTGNY 서열 183
097909	서열 81	서열 102	서열 163	서열 183
CXCR2007	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGSIITD 141	WYRQAPKQKRELVV 서열 102	RRTRGGNINVAIDVKG 서열 163	EIVVLGVWVWVQRRARTGNY 서열 183
9	서열 231	서열 235	서열 236	서열 181
CXCR2007	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGSIITD 141	WYRQAPKQKRELVV 서열 235	RRTRGGNINVAIDVKG 서열 236	NIRGQDY 서열 181
127001	서열 79	서열 100	서열 161	서열 181
CXCR2007	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGSIITD 141	WYRQAPKQKRELVV 서열 100	RRTRGGNINVAIDVKG 서열 161	NIRGQDY 서열 181
6	서열 232	서열 105	서열 237	서열 186
CXCR2007	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGSIITD 146	WYRQAPKQKRELVV 서열 105	RRTRGGNINVAIDVKG 서열 237	GSSSWLSFPPDY 서열 186
163803	서열 84	서열 105	서열 166	서열 186
CXCR2007	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGSIITD 146	WYRQAPKQKRELVV 서열 105	RRTRGGNINVAIDVKG 서열 166	GSSSWLSFPPDY 서열 186
9	서열 233	서열 104	서열 165	서열 185
CXCR2008	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGSIITD 145	WYRQAPKQKRELVV 서열 104	RRTRGGNINVAIDVKG 서열 165	GSSSWLSFPPDY 서열 185
163802	서열 83	서열 104	서열 165	서열 185
CXCR2008	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGSIITD 145	WYRQAPKQKRELVV 서열 104	RRTRGGNINVAIDVKG 서열 165	GSSSWLSFPPDY 서열 185
4	서열 234	서열 234	서열 171	서열 191
CXCR2010	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGSIITD 151	WYRQAPKQKRELVV 서열 234	RRTRGGNINVAIDVKG 서열 171	GSSSWLSFPPDY 서열 191
054812	서열 89	서열 110	서열 171	서열 191
CXCR2010	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSQAASGSIITD 151	WYRQAPKQKRELVV 서열 110	RRTRGGNINVAIDVKG 서열 171	GSSSWLSFPPDY 서열 191

표 35

서열 최적화 변이체의 코티아 CDR 주석

	HCDR1	HCDR2	HCDR3
CXCR20059	GSILTN	TRGGS	DDRGGVY
CXCR20063	GSILTN	TRGGS	DDRGGVY
CXCR20061	GSIVRIN	TSGGN	EIVVLGVWVWVQRRARTGNY
CXCR20079	GSTFDK	RLSGN	NIRGQDY
CXCR20076	GRIFSSN	TWRSGGS	GGSSWLSFPPDY
CXCR20086	GRTFSDY	TWNGGR	DKDRRTDYLGHPVAY
CXCR20104	GSTFRIN	DRGGY	GTQDRVGRNFDR

- [0499] 22. 에피토프 맵핑
- [0500] 나노바디의 에피토프 맵핑은 인테그랄 몰레큘라 인크.(Integral Molecular Inc., 미국 펜실베이니아주 필라델피아 스위트 900 마켓 스트리트 3711, www.integralmolecular.com)에 의해 그의 샷건(Shotgun) 돌연변이유발 기술을 이용하여 수행되었다.
- [0501] 샷건 돌연변이유발 기술 요약
- [0502] 샷건 돌연변이유발은 진핵 세포 내의 돌연변이된 표적 단백질의 큰 라이브러리의 발현 및 분석을 가능하게 하는 독점적 고처리량 세포 발현 기술을 이용한다. 단백질 내의 모든 잔기는 통상적으로 기능의 변화를 검정하기 위해 다수의 다른 아미노산으로 개별적으로 돌연변이된다. 단백질은 표준 포유동물 세포주 내에서 발현되고, 따라서 심지어 진핵 번역 또는 번역후 처리를 필요로 하는 어려운 단백질도 맵핑될 수 있다.
- [0503] 에피토프 맵핑에 대한 명명법은 다음과 같다:
- [0504] RDHBC 792 = CXCR20079
- [0505] RDHBC 793 = CXCR20061
- [0506] RDHBC 792 = CXCR20076
- [0507] 항-CXCR2 항체 RD-HBC792 (CXCR20079), RD-HBC793 (CXCR220061) 및 RD-HBC794 (CXCR20076)의 에피토프를 다음과 같이 샷건 돌연변이유발을 사용하여 단일 아미노산 해상도에서 맵핑하였다.
- [0508] 모 구축물: 태그부착되지 않은 모 유전자를 고발현 벡터에 클로닝하고, 서열을 분석하고, 면역검출에 의해 발현에 대해 검증하였다. 나노바디 최적화: 나노바디의 검출은 394-웰 마이크로플레이트 내의 나노바디 희석액의 패널을 검정함으로써 샷건 돌연변이유발 포맷으로 최적화하였다. 각각의 나노바디의 최적 농도를 돌연변이 라이브러리를 스크리닝하기 위해 선택하였다. 돌연변이 라이브러리를 완성하고, 각각의 아미노산 위치를 모든 잔기의 Ala 치환으로의 돌연변이를 비롯하여 보존 및 비-보존된 변화로 돌연변이시켰다. 라이브러리를 표면 발현에 대해 시험하고 면역검출에 의해 나노바디 결합에 대해 삼중으로 스크리닝하였다. 나노바디 결합의 손실에 대한 라이브러리의 분석을 수행하였고, 중요 잔기가 확인되고 맵핑되었다.
- [0509] 모 구축물 발현: 일시적으로 발현된 야생형 모 구축물의 면역검출을 면역발광 및 면역형광에 의해 384웰 포맷으로 수행하였다. 모든 실험에 대해, 세포 형질감염 및 면역염색에 수반되는 액체 취급 단계는 정확성 및 높은 실험적 재현성을 보장하기 위해 액체 취급 로봇을 사용하여 수행하였다.

**표 36**

실험 파라미터	면역발광	면역형광
세포	<b>HEK-293T</b>	<b>HEK-293T</b>
고정제	<b>4% PFA</b>	<b>4% PFA</b>
차단 완충제	10% 염소 혈청	10% 염소 혈청
1°MAb 표적 농도 인큐베이션 제조업체 카탈로그 번호	α-CXCR2 2 ug/ml 1 시간 R&D 시스템스 (R&D Systems) MAB331	α-CXCR2 3 ug/ml 1 시간 R&D 시스템스 MAB331
2°MAb 표적 농도 제조업체 카탈로그 번호	α-마우스 HRP 0.8 ug/ml 잭슨 이뮤노리서치 (Jackson Immunoresearch) 115-035-003	α-마우스 다이라이트 (Dyelight) 549 3.75 ug/ml 잭슨 이뮤노리서치 115-505-003
세척	<b>PBS++</b>	<b>PBS++</b>
신호:배경	<b>29:1</b>	<b>2.2:1</b>
모체의 % CV	<b>4.7%</b>	<b>12%</b>

- [0510] 모 플라스미드의 시험에 이용된 실험 파라미터.

표 37

폴리클로날 혈청을 사용하는 총 수용체 세포 표면 발현의 검출. 폴리클로날 혈청 (모든 돌연변이체와 반응할 수 있음)을 사용하여 총 발현을 정량화 함으로써 돌연변이 라이브러리에서 각각의 클론을 검출할 수 있음. 실험 파라미터	폴리클로날 면역검출
세포	HEK-293T
고정제	4% PFA
차단 완충제	10% 염소 혈청
1°PAb 표적 농도 인큐베이션 제조업체 카탈로그 번호	$\alpha$ -CXCR2 1:1,000 희석 1 시간 노부스 (Novus) NBP1-49218
2°Mab 표적 농도 제조업체 카탈로그 번호	$\alpha$ -토끼 HRP 0.8 ug/ml 서던 바이오테크 (Southern Biotech) 4050-05
세척	PBS++
신호:배경	17:1
% CV	10%

폴리클로날 면역검출에 이용된 실험 파라미터.

[0511]

[0512]

결론: 강력한 표면 발현 및 전체 발현이 대조군 MAb 및 폴리클로날 혈청을 사용하여 야생형 모 구조물에 대해 검출되고, 따라서 야생형 모 구조물은 샷건 돌연변이유발을 위해 사용될 수 있다. 면역발광 검정은 고신호:배경 및 낮은 가변성을 보이고, 맵핑 연구에 사용될 것이다.

[0513]

면역검출을 맵핑 나노바디를 사용하여 최적화하였다. 면역검출은 야생형 수용체 또는 벡터 단독 플라스미드로 일시적으로 형질감염된 세포를 사용하여 384-웰 포맷으로 수행하였다. 추가의 맵핑 연구에 대해 선택된 농도는 고신호:배경 및 낮은 가변성과 함께 최대 신호에 근접한 신호를 기초로 하였다.

표 38

돌연변이 라이브러리의 스크리닝을 위한 최종 검정 조건

실험 파라미터	RD-HBC792	RD-HBC793	RD-HBC794
세포	HEK-293T	HEK-293T	HEK-293T
고정제	4% PFA	4% PFA	4% PFA
차단 완충제	10% 염소 혈청	10% 염소 혈청	10% 염소 혈청
1°MAb 표적 최적 농도 인큐베이션	$\alpha$ -CXCR2 1.0 ug/ml 1 시간	$\alpha$ -CXCR2 1.0 ug/ml 1 시간	$\alpha$ -CXCR2 2.0 ug/ml 1 시간
2°MAb 표적 농도 인큐베이션 제조업체 항체명	$\alpha$ -myc 2 ug/ml 1 시간 자사 하이브리도마 9E10	$\alpha$ -myc 2 ug/ml 1 시간 자사 하이브리도마 9E10	$\alpha$ -myc 2 ug/ml 1 시간 자사 하이브리도마 9E10
3°MAb 표적 농도 제조업체 카탈로그 번호	$\alpha$ -마우스 HRP 0.8 ug/ml 썬슨  이뮤노리서치 115-035-003	$\alpha$ -마우스 HRP 0.8 ug/ml 썬슨  이뮤노리서치 115-035-003	$\alpha$ -마우스 HRP 0.8 ug/ml 썬슨  이뮤노리서치 115-035-003
세척	PBS++	PBS++	PBS++
신호:배경	13:1	6.9:1	20:1
% CV	7.9%	22%	13%

샷건 돌연변이유발 384-웰 포맷에서 최적화 검정 검출을 위해 사용되는 실험 파라미터.

[0514]

[0515]

본원에 정의된 최적화된 검정 조건을 384-웰 포맷으로 CXCR2 돌연변이 라이브러리를 맵핑하기 위해 사용하였다. 라이브러리 내의 각각의 클론은 일시적 형질감염에 의해 세포에서 발현되었고, 대략 형질감염 18시간 후에 나노바디 반응성에 대해 검정하였다. CXCR2 나노바디 RD-HBC792, RD-HBC793 및 RD-HBC794는 Fc 영역이 결여되지만, myc-태그를 함유하고, 따라서 중간체 마우스 항-myc 항체 (9E10)가 사용되는 다단계 검출 전략을 사용한 후, 항-마우스 HRP 항체를 사용하여 검출하였다.

[0516]

결론: 3개의 CXCR2 나노바디의 면역검출 및 에피토프 맵핑을 위한 최종 조건을 결정하였다. 최적화된 조건은 샷건 돌연변이유발 포맷에서 고신호:배경 및 낮은 가변성을 생성하였고, 따라서 높은 신뢰도로 에피토프 맵핑을 위해 사용될 수 있다. 에피토프 맵핑은 여기서 결정된 동일한 검정 조건을 적용하되, 수용체 변이체의 돌연변이 라이브러리를 사용하는 것을 수반하였다.

[0517]

나노바디 에피토프에 대한 결정적인 잔기의 확인

표 39

관기 ID	돌연변이	클론_ID	폴리클로날		RD HBC 792		RD HBC 793		RD HBC 794	
			평균	표준편차	평균	표준편차	평균	표준편차	평균	표준편차
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

결정적 잔기의 확인

[0518]

MAb에 결정적인 잔기는 클론의 나노바디 반응성을 폴리클로날 반응성 (표면 발현)에 비교함으로써 확인되었다. 항체 에피토프에 포함되는 잔기는 나노바디 결합에 대해 음성이지만 폴리클로날 결합에 대해 양성인 것으로서 확인되었고, A1a 잔기 치환 (즉, 잔기의 측쇄의 제거)을 포함하고, 세포의 루프에 위치하였다. MAb 결합 및 폴리클로날 항체 결합에 대한 평균 반응성 및 표준 편차가 제시된다. 각각의 MAb에 대해 확인된 결정적인 잔기는 회색으로 음영처리하였다. 또한, RD HBC792에 대한 데이터를 RD HBC793과 비교하였고, 그 이유는 RD HBC792에 대한 결합 프로파일의 상업적 폴리클로날 혈청 (인간 CXCR2의 N-말단 세포의 도메인으로부터 유래됨, 이는 아마도 F11, F14 및 W15 돌연변이에 대한 혈청의 저하된 반응성을 설명함)과 유사한 것으로 밝혀졌기 때문이다.

[0520]

에피토프 정보의 추가의 분석

[0521]

샷건 돌연변이유발 맵핑에 의해 확인된 결정적인 아미노산은 3개의 CXCR2 MAb에 대한 결합 부위(들)를 규정한다. MAb RD HBC792를 CXCR2의 N-말단 영역에 맵핑하고, 결정적인 잔기의 밀집한 접근성은 에피토프가 실제로 선형임을 시사한다. MAb RD HBC793 및 RD HBC794는 주로 CXCR2의 ECL1 및 ECL3에 의해 형성된 입체형태적으로 복잡한 에피토프에 결합하는 것으로 보인다. 또한, 세포의 루프를 케모카인 수용체 내에서 제자리에 유지하는 2개의 디설피드 브릿지를 형성하는 것으로 알려진 세포의 Cys 잔기의 돌연변이는 MAb 793 및 794의 결합을 제거하고, 이에 따라 에피토프 상호작용에 직접 관여하는 것으로 여겨지지 않는다. 이들 둘 사이의 미묘한 차이가 명백하더라도, 793 및 794의 에피토프는 유의하게 중첩된다.

[0522]

23. 재조합 세포주에서의 CXCR2 선택성

[0523]

세포내 칼슘의 효능제-유도된 방출 (FLIPR)

[0524]

CXCR2 선택성을 확인하기 위해 상이한 1가 항-CXCR2 나노바디를 개별 나노바디 빌딩 블록이 35GS 링커에 의해 분리된 1가, 2가 또는 이중파라토프성 구축물로서 합하였다.

[0525]

인간 CXCR2 수용체를 발현하는 RBL 세포를 Fluor-4 염료와 30분 동안 37°C에서 로딩한 후에 정제된 1가, 2가 또는 이중파라토프성 나노바디와 30분 인큐베이션하였다. 최종적으로, 형광측정 영상화 플레이트 판독기 (FLIPR)를 이용하여 GRO α의 첨가를 수행한 후에 세포내 칼슘의 방출에 상응하는 형광 신호를 검출하였다. 인간

CXCR1을 발현하는 L2071 세포를 사용하여 선택성 검정을 수행하였다. 검정 프로토콜은 CXCR2에 대해 기재된 바와 동일하게 유지하였으나, IL-8이 효능제로서 사용되었다. 대표적인 결과는 도 3에 제시된다.

[0526] 24. 항-HSA (A1b8)로의 반감기 연장

[0527] 호중구는 염증에서의 주요 전염증성 세포 중 하나로, 화학주성인자 작용을 매개하는 높은 수준의 CXCR2 수용체를 발현한다. CXCR2 리간드 (GRO α)로의 자극 또는 대조군 자극 (FMLP) 후의 호중구 형상 변화는 유동 세포측정법에 의해 정량화될 수 있고, 활성화 마커로 사용될 수 있다.

[0528] 본 연구에서, 항-CXCR2 나노바디를 생체내에서 프로파일링하여 NB-NB (비-HLE: CXCR20076-35GS-CXCR20079 (또한, 실시예에서 76-79로서 지칭됨))에 비해 반감기 연장된 나노바디 (HLE: CXCR20076-35GS-CXCR20079-A1b8 (또한, 실시예에서 76-79-A1b8로서 지칭됨))의 약역학적 특성을 결정하였다. 단일 용량 나노바디를 시노몰구스 원숭이에 등물 용량: 비포맷된 나노바디 (NB-NB, 0.3 mg/kg) 또는 A1b8 (항-HSA) 도메인에 의해 연장된 나노바디 (NB-NB-A1b8, 0.45 mg/kg)에서 정맥내로 주사하고, 투여전 및 투여후 35일까지 다양한 시점에 혈액을 수집하였다. 모든 구축물은 제1 샘플링 시점 (주사후 1시간 또는 3시간)에서 생체의 전혈 호중구 형상 변화 (WBSC)를 완전히 억제하였다. 강한 PD 억제 (WBSC)는 NB-NB 비-HLE 나노바디에서의 30시간에 비해 NB-NB-A1b8 융합체에서의 9일의 보다 긴 지속기간으로 증명되었다.

[0529] 25. 나노바디 79-76-A1b8 및 79-86-A1b8은 CXCR2 기능적 활성을 완전히 차단한다

NVP	GROα 에 대한 IC <sub>50</sub> (nM)			
	CHO-hCXCR2 GTPyS	단리된 hSCA	hWBSCA	NHP WBSC
	평균 ± SD N = 3	평균 ± SEM N = 3	평균 ± SEM N = 6-12	평균 ± SEM N = 4
(79-76-A1b8)	2.86 ± 0.11	0.26 ± 0.04	0.11 ± 0.00	0.76 ± 0.25
(79-86-A1b8)	2.03 (n=1)	0.16 ± 0.01	0.11 ± 0.	0.6 ± 0.5 (SD n=3)

[0531] 나노바디 79-76-A1b8-AA 및 79-86-A1b8-AA는 기능적으로 동등하고, CXCR2 기능을 완전히 차단한다. 따라서, 항체는 C-말단에서의 Ala-Ala 변이체의 첨가에 의해 변경되지 않는다.

NVP	GROα 에 대한 IC <sub>50</sub> (nM)			
	CHO-hCXCR2 GTPyS	단리된 hSCA	hWBSCA	NHP WBSC
	평균 ± SD N = 3	평균 ± SD N = 3	평균 ± SEM N = 6-8	평균 ± SEM N = 4
(79-76-A1b8-AA)	1.31 ± 0.41	0.25 ± 0.06	0.15 ± 0.01	1.36 ± 0.7
(79-86-A1b8-AA)	2.63 ± 1.74	0.26 ± 0.06	0.19 ± 0.02	0.72 ± 0.2

[0533] 26. 건강한 자원자에서 CXCR2 나노바디와 상호작용하는 IgG 항체의 검출 및 C-말단 연장부의 효과.

[0534] 인간 혈청에서 CXCR20079-35GS-CXCR20076 (79-76), CXCR20079-35GS-CXCR20076-ALB8 (79-76-A1b8) CXCR20079-35GS-CXCR20086 (79-86) 및 CXCR20079-35GS-CXCR20086-ALB8 (79-86-A1b8)에 대한 IgG 항체 결합의 형성을 샌드위치 ELISA에서 건강한 공여자 혈청 (44명 남성 및 44명 여성)을 스크리닝함으로써 평가하였다. 간략하게, 나노바디 CXCR20079-35GS-CXCR20076-ALB8을 마이크로타이터 플레이트 상에 직접 고정화시켰다. 항-나노바디 항체를 고정화된 나노바디에 의해 포획하고, 양고추냉이 퍼옥시다제와 커플링된 항-인간 IgG-(Fc 특이적) 항체에 의해 검출하였다. 기질 TMB와의 인큐베이션 후에, 효소적 반응의 유색 생성물의 광학 밀도 (OD)를 450 nm에서 측

정하였다. 사용되는 양성 대조군 항체는 인간 항-CXCR2 항체 NOV0205 (1M8) (과지-디스플레이에 의해 내부적으로 생성됨), 배치 ACE00277이었다. 검정이 유효화된, 평균 정규화 OD (OD 샘플/OD 음성 대조군)가 아니므로 예비 절단점을 추정하였다.

[0535] 44명의 남성 및 44명의 여성 건강한 공여자 혈청을 남성의 50% 및 여성의 61%의 샘플로 시험하여 검정을 위한 예비 스크리닝 절단점 상에서 모 나노바디와의 반응성을 입증하였다 (하기 도면 참조).

[0536] 어떠한 설명, 메카니즘 또는 가설에도 제한되지 않고, 증거는 IgG가 CH1 도메인에 의해 항체에서 정상적으로 숨겨지는 영역인 인간화 Vh 도메인 내의 입체형태적 에피토프와 상호작용한다는 것을 시사한다. 이러한 상호작용을 차단하기 위해 다양한 C-말단 연장부 (A, AA, AS, AST, ASTKP, GGGS)를 생성하고, 항-Nb IgG 및 기능적 활성에 대해 시험하였다. 하기 도면에 제시된 데이터는 AA C-말단 연장부를 갖는 이중과라토프성 반감기 연장된 나노바디 79-76-A1b8-AA가 항-Nb IgG 반응성을 남성에서는 50%에서 20%로 및 여성에서는 61%에서 16%로 유의하게 감소시켰다는 것을 보여준다. 또한, Ala-Ala C-말단 변이체 79-76-A1b8-AA 및 79-86-A1b8-AA는 c-말단 연장부가 없는 나노바디 79-76-A1b8 및 79-86-A1b8에 비교한 경우에 기능적 활성을 변경시키지 않았다 (도 4 참조).

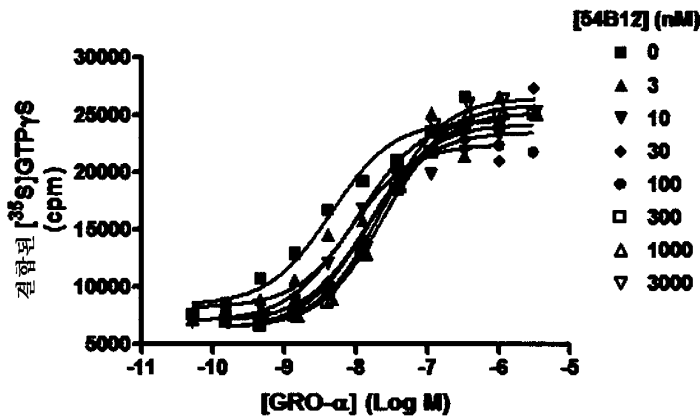
[0537] 27. CXCR2에 대한 이중과라토프성 나노바디를 사용한 화학주성의 억제

[0538] 화학주성을 화학물질 농도 구배에 따른 세포의 방향성 운동이다. 생체내에서 이는 혈관으로부터 내피를 통한 조직으로의 식세포, 예컨대 호중구의 이동과 관련된다. 참조를 위해, 문헌 [Boyden S (1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. J Exp Med; 115:453-466 및 Frevert C, Wong V, Goodman R, et al. (1998) Rapid fluorescence-based measurement of neutrophil migration in vitro. J Immunol Methods; 213(1):41-52]을 참조한다.

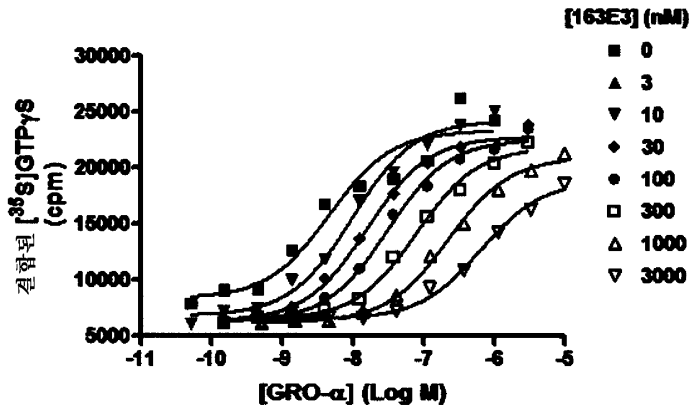
[0539] 시험관내에서 이러한 과정을 모방하기 위해 본 발명자들은 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson)으로부터의 3 μm 폴리에스테르 막을 이용하여 트랜스웰 검정을 개발하였다. 간략하게, EC<sub>50</sub> 농도의 케모카인 (2 nM rhGRO-α)을 수용자 플레이트의 하부 웰에 첨가한 후에, 다중웰 삽입물을 위치로 낮추었다. 말초 혈액으로부터 새로 단리하고 실용성 염료, 칼세인-AM으로 표지한 인간 호중구를 변화하는 농도의 나노바디 (0.007 - 30 nM)와 30분 동안 실온에서 예비인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 다중웰 삽입물에 첨가하고, 90분 동안 37°C에서 인큐베이션한 후에 삽입물을 제거하여 폐기하였다. 이어서, 수용자 플레이트의 웰로 이동한 세포로부터의 형광을 485 nm 여기 및 520 nm 방출에서 바이오텍 시너지(BioTek Synergy) 플레이트 판독기 상에서 측정하였다. 항-CXCR2 나노바디, 79-76-A1b8-AA는 rhGRO-α-자극된 화학주성을 0.256 ± 0.02 nM의 IC<sub>50</sub> 값 (n=4 공여자로부터의 평균 ± SEM)으로 억제하였다 (도 5 참조).

**도면**

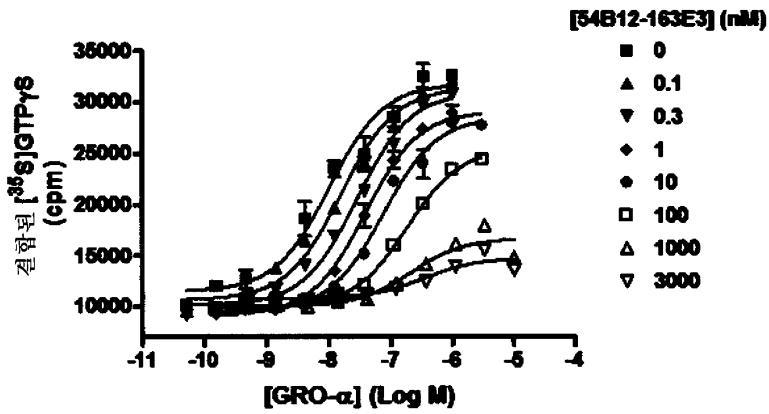
**도면1a**



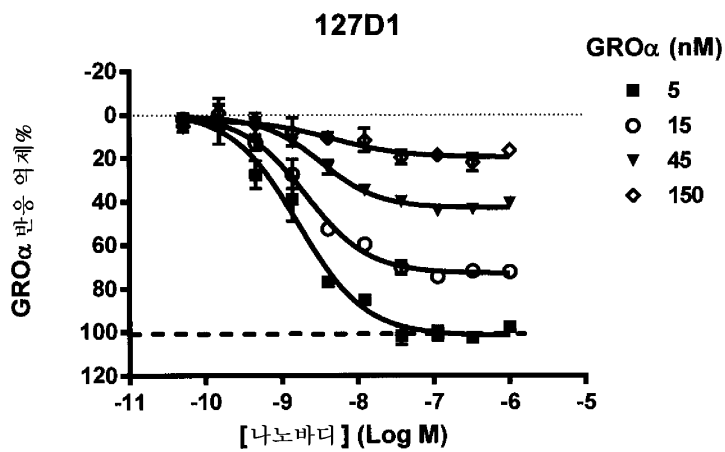
도면1b



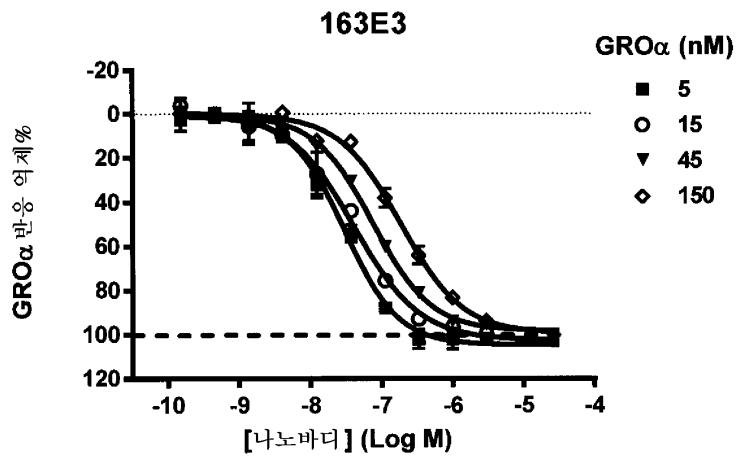
도면1c



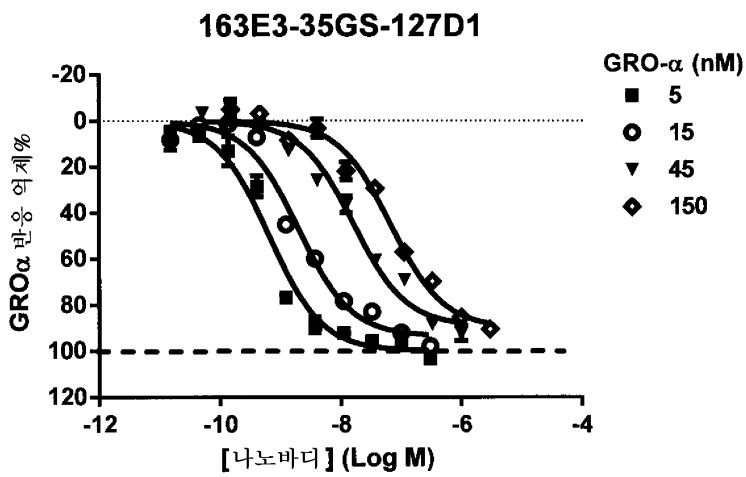
도면2a



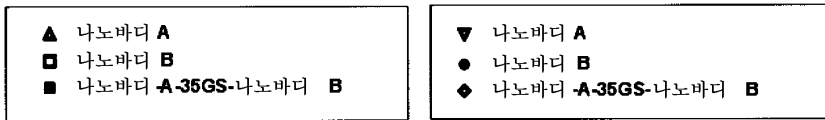
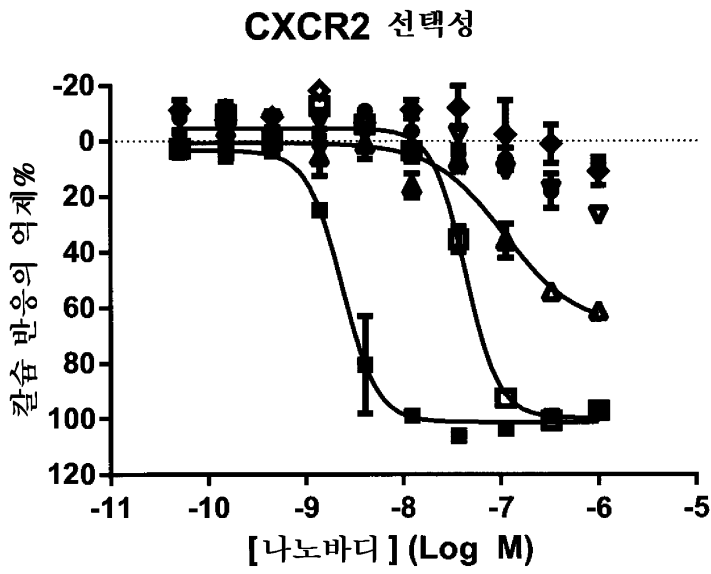
도면2b



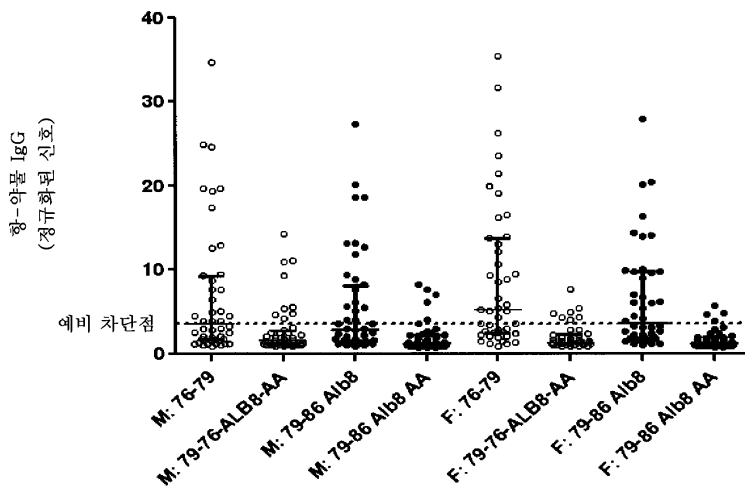
도면2c



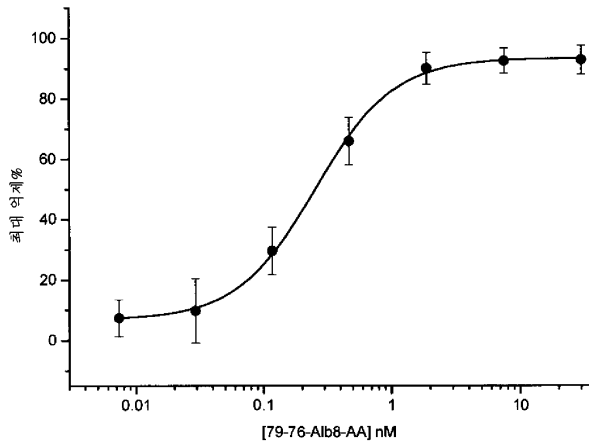
도면3



도면4



도면5



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> NOVARTIS AG

<120> CHEMOKINE RECEPTOR BINDING POLYPEPTIDES

<130> PAT055116

<160> 248

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Asp Phe Asn Met Glu Ser Asp Ser Phe Glu Asp Phe Trp Lys

1                                5                                10                                15

Gly Glu Asp Leu Ser Asn Tyr Ser Tyr Ser Ser Thr Leu Pro Pro Phe

20                                25                                30

Leu Leu Asp Ala Ala Pro Cys Glu Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys

35                                40                                45

Tyr Phe Val Val Ile Ile Tyr Ala Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Leu

50                                55                                60

Gly Asn Ser Leu Val Met Leu Val Ile Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg

65                                70                                75                                80

Ser Val Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu

85 90 95  
 Phe Ala Leu Thr Leu Pro Ile Trp Ala Ala Ser Lys Val Asn Gly Trp  
  
 100 105 110  
 Ile Phe Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu Lys Glu Val  
 115 120 125  
 Asn Phe Tyr Ser Gly Ile Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ser Val Asp Arg  
 130 135 140  
 Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg Tyr  
 145 150 155 160  
 Leu Val Lys Phe Ile Cys Leu Ser Ile Trp Gly Leu Ser Leu Leu Leu  
  
 165 170 175  
 Ala Leu Pro Val Leu Leu Phe Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val  
 180 185 190  
 Ser Pro Ala Cys Tyr Glu Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Asn Trp Arg  
 195 200 205  
 Met Leu Leu Arg Ile Leu Pro Gln Ser Phe Gly Phe Ile Val Pro Leu  
 210 215 220  
 Leu Ile Met Leu Phe Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys  
  
 225 230 235 240  
 Ala His Met Gly Gln Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala Val  
 245 250 255  
 Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Asn Leu Val Leu Leu  
 260 265 270  
 Ala Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg  
 275 280 285  
 Arg Asn His Ile Asp Arg Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Ile  
  
 290 295 300  
 Leu His Ser Cys Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys  
 305 310 315 320  
 Phe Arg His Gly Leu Leu Lys Ile Leu Ala Ile His Gly Leu Ile Ser  
 325 330 335

Lys Asp Ser Leu Pro Lys Asp Ser Arg Pro Ser Phe Val Gly Ser Ser  
 340 345 350

Ser Gly His Thr Ser Thr Thr Leu  
 355 360

<210> 2

<211> 344

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

Tyr Phe Val Val Ile Ile Tyr Ala Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Leu  
 35 40 45

Gly Asn Ser Leu Val Met Leu Val Ile Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg  
 50 55 60

Ser Val Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu  
 65 70 75 80

Phe Ala Leu Thr Leu Pro Ile Trp Ala Ala Ser Lys Val Asn Gly Trp  
 85 90 95

Ile Phe Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu Lys Glu Val  
 100 105 110

Asn Phe Tyr Ser Gly Ile Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ser Val Asp Arg  
 115 120 125

Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg Tyr  
 130 135 140

Leu Val Lys Phe Ile Cys Leu Ser Ile Trp Gly Leu Ser Leu Leu Leu  
 145 150 155 160

Ala Leu Pro Val Leu Leu Phe Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val  
 165 170 175

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

180 185 190

Met Leu Leu Arg Ile Leu Pro Gln Ser Phe Gly Phe Ile Val Pro Leu

195 200 205

Leu Ile Met Leu Phe Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys

210 215 220

Ala His Met Gly Gln Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala Val

225 230 235 240

Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Asn Leu Val Leu Leu

245 250 255

Ala Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg

260 265 270

Arg Asn His Ile Asp Arg Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Ile

275 280 285

Leu His Ser Cys Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys

290 295 300

Phe Arg His Gly Leu Leu Lys Ile Leu Ala Ile His Gly Leu Ile Ser

305 310 315 320

Lys Asp Ser Leu Pro Lys Asp Ser Arg Pro Ser Phe Val Gly Ser Ser

325 330 335

Ser Gly His Thr Ser Thr Thr Leu

340

<210> 3

<211> 355

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 3

Met Gln Ser Phe Asn Phe Glu Asp Phe Trp Glu Asn Glu Asp Phe Ser

1 5 10 15

Asn Tyr Ser Tyr Ser Ser Asp Leu Pro Pro Ser Leu Pro Asp Val Ala

20 25 30

Pro Cys Arg Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys Tyr Phe Val Val Ile  
 35 40 45  
 Ile Tyr Ala Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Leu Gly Asn Ser Leu Val  
 50 55 60  
 Met Leu Val Ile Leu His Ser Arg Val Gly Arg Ser Ile Thr Asp Val  
 65 70 75 80  
 Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Met Ala Asp Leu Leu Phe Ala Leu Thr Leu  
 85 90 95  
 Pro Ile Trp Ala Ala Ala Lys Val Asn Gly Trp Ile Phe Gly Thr Phe  
 100 105 110  
 Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu Lys Glu Val Asn Phe Tyr Ser Gly  
 115 120 125  
 Ile Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val  
 130 135 140  
 His Ala Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg Tyr Leu Val Lys Phe Val  
 145 150 155 160  
 Cys Leu Ser Ile Trp Ser Leu Ser Leu Leu Leu Ala Leu Pro Val Leu  
 165 170 175  
 Leu Phe Arg Arg Thr Val Tyr Leu Thr Tyr Ile Ser Pro Val Cys Tyr  
 180 185 190  
 Glu Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Lys Trp Arg Met Val Leu Arg Ile  
 195 200 205  
 Leu Pro Gln Thr Phe Gly Phe Ile Leu Pro Leu Leu Ile Met Leu Phe  
 210 215 220  
 Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys Ala His Met Gly Gln  
 225 230 235 240  
 Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala Val Val Leu Ile Phe Leu  
 245 250 255  
 Leu Cys Trp Leu Pro Tyr His Leu Val Leu Leu Ala Asp Thr Leu Met  
 260 265 270  
 Arg Thr Arg Leu Ile Asn Glu Thr Cys Gln Arg Arg Asn Asn Ile Asp

275 280 285  
 Gln Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Ile Leu His Ser Cys Leu  
 290 295 300  
 Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys Phe Arg His Gly Leu  
 305 310 315 320  
 Leu Lys Ile Leu Ala Thr His Gly Leu Ile Ser Lys Asp Ser Leu Pro  
 325 330 335  
 Lys Asp Ser Arg Pro Ser Phe Val Gly Ser Ser Ser Gly His Thr Ser

340 345 350  
 Thr Thr Leu  
 355

<210> 4  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Macaca fascicularis*  
 <400> 4

Met Gln Ser Phe Asn Phe Glu Asp Phe Trp Glu Asn Glu Asp  
 1 5 10  
 <210> 5  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Macaca fascicularis*  
 <400> 5

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

<210> 6  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> *Macaca fascicularis*  
 <400> 6

Cys Arg Arg Thr Val Tyr Leu Thr Tyr Ile Ser Pro Val Leu Tyr Glu

1                    5                    10                    15  
 Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Leu Trp Cys

20                    25

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Glu Asp Phe Asn Met Glu Ser Asp Ser Phe Glu Asp Phe Trp Lys

1                    5                    10                    15

Gly Glu Asp

<210> 8

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Asp Leu Ser Asn Tyr Ser Tyr Ser Ser Thr Leu Pro Pro Phe Leu

1                    5                    10                    15

Leu Asp Ala Ala Pro Cys Glu Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys

20                    25                    30

<210> 9

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Phe Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val Ser Pro Ala Cys Tyr Glu

1                    5                    10                    15

Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Asn Trp Arg

20                    25

<210> 10

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Cys Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val Ser Pro Ala Leu Tyr Glu

1                    5                    10                    15

Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Asn Trp Cys

                  20                    25

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg Arg

1                    5                    10                    15

Asn His

<210> 12

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Cys Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Leu Glu Arg Arg

1                    5                    10                    15

Asn Cys

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRIMER

<400> 13

ggctgagctg ggtggtcctg g

21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> PRIMER  
 <400>  
 > 14  
 ggctgagttt ggtggctcctg g 21  
 <210> 15  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PRIMER  
 <400> 15  
 ggtacgtgct gttgaactgt tcc 23  
 <210> 16  
 <211> 55  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PRIMER  
 <400> 16  
 catttgagtt ggctagccg gccatggcag aggtgcagct ggtggagtct ggggg 55  
 <210> 17  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223>  
 PRIMER  
 <400> 17  
 tgtaaacga cggccagt 18  
 <210> 18  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PRIMER  
 <400> 18  
 caggaaacag ctatgacc 18  
 <210> 19

<211> 88  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PRIMER  
 <400> 19  
 tcagtaacct ggatccccg ccaccgctgc ctccaccgcc gctacccccg ccaccgctgc 60  
 ctccaccgcc tggagagacg gtgacctg 88

<210> 20  
 <211> 84  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PRIMER  
 <400> 20  
 aggttactga ggatccggcg gtggaggcag cggaggtggg ggctctggtg gcgggggtag 60  
 cgaggtgcag ctggtggagt ctgg 84

<210> 21  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PRIMER  
 <400> 21  
 gaggtgcaat tggaggagtc tggg 24

<210> 22  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PRIMER  
 <400> 22  
 tgaggagacg gtgacctggg tccc 24

<210> 23  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> PRIMER  
 <400> 23  
 tcttgatcc gaggtgcagc tggtaggagtc tggg 34  
 <210> 24  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PRIMER  
 <400> 24  
 accgcctccg gaggagaccg tgacctgggt ccc 33  
 <210> 25  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies  
 <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> Artificial Sequence

<220><223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 26

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Leu Ser Gly Arg Ile Gly Ser Ile Asn  
                   20                    25                    30  
 Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Val Ser Gly Gln Gln Arg Glu Leu Val  
                   35                    40                    45

Ala Val Ser Arg Ser Gly Gly Ser Thr Asp Ile Ala Asp Ser Val Lys  
                   50                    55                    60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65                    70                    75                    80  
 Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr  
                   85                    90                    95  
 Ala His Thr Ser Ser Tyr Ser Asn Trp Arg Val Tyr Asn Asn Asp Tyr  
                   100                    105                    110

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

<210> 27

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies

<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> Artificial Sequence

<220><223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies

<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> Artificial Sequence  
 <220><223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies  
 <400> 29  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val  
 35 40 45  
 Ser Cys Ile Ser Gly Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ala Tyr Trp Gly Leu Thr Leu Arg Leu Trp Met Pro Pro His Arg

100 105 110  
 Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125  
 <210> 30  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies  
 <400> 30  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 31

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 31

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

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

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

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

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

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

Ile Glu Thr Leu Arg Arg Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 32

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 32

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ala Ile Asn Lys Ser Gly Gly Asn Thr His Tyr Ala Gly Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 33

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 33

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies

<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> Artificial Sequence

<220><223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies

<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> Artificial Sequence

<220><223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies

<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> Artificial Sequence

<220><223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies

<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> Artificial Sequence

<220><223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15  
 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Ser Phe Arg Ile Asn  
 20 25 30

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

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

Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Pro Thr Met Tyr Leu

65 70 75 80  
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His  
 85 90 95

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

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 39

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies

<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> Artificial Sequence

<220><223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Leu  
                   20                    25                    30  
 Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Ala Phe Val  
                   35                    40                    45  
 Ala Ala Leu Thr Arg Asn Gly Gly Tyr Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
                   50                    55                    60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Val Ala Lys Lys Thr Leu Tyr

65                    70                    75                    80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                                   85                    90                    95  
 Ala Ala Asp Ser Leu Ser Gly Ser Asp Tyr Leu Gly Thr Asn Leu Asp  
                                   100                    105                    110

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

<210> 41

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies

<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> Artificial Sequence

<220><223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ser Asn

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser

                  50                    55                    60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp

                  100                    105                    110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

                  115                    120

<210> 43

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 43

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys

50                      55                      60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met Tyr Leu  
 65                      70                      75                      80  
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Met  
  
                          85                      90                      95  
 Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
                          100                      105                      110  
 Val Ser Ser  
                          115  
 <210> 44  
 <211> 287  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> multivalent anti-CXCR2 Nanobodies  
 <400> 44  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg Ile Asn  
  
                          20                      25                      30  
 Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
                          35                      40                      45  
 Ala Asp Ile Thr Ser Gly Gly Asn Ile Asn Tyr Ile Asp Ala Val Lys  
                          50                      55                      60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
 65                      70                      75                      80  
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
  
                          85                      90                      95  
 Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala Arg Thr  
                          100                      105                      110  
 Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly  
                          115                      120                      125  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

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

145 150 155 160  
 Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 165 170 175

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

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

Val Ala Asp Ile Thr Ser Gly Gly Asn Ile Asn Tyr Ile Asp Ala Val

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

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

245 250 255  
 Asn Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala Arg

260 265 270  
 Thr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

275 280 285

<210> 45

<211> 257

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> multivalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 45

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

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

Ala Leu Gly Trp Thr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Ala Arg Glu Trp Val

35

40

45

Ala Gly Ile Asn Ser Asp Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 His Met Asp Met Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Ser Gly Lys Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly  
 100 105 110  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
 145 150 155 160  
 Gly Gly Ser Val Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Ile Phe Arg  
 165 170 175  
 Leu Ser Ala Leu Gly Trp Thr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Ala Arg Glu  
 180 185 190  
 Trp Val Ala Gly Ile Asn Ser Asp Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Pro  
 195 200 205  
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ile  
 210 215 220  
 Tyr Leu His Met Asp Met Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 225 230 235 240  
 Cys Ala Ser Gly Lys Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
 245 250 255  
 Ser

<210> 46

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn

20                    25                    30

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

35                    40                    45

Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr

100                    105                    110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115                    120                    125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

130                    135                    140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly

145                    150                    155                    160

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly

165                    170                    175

Ser Ile Val Arg Ile Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly

180                    185                    190

Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Asp Ile Thr Ser Gly Gly Asn Ile Asn

195                    200                    205

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

210                    215                    220

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr

225                    230                    235                    240  
 Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp  
                                  245                    250                    255  
 Thr Gln Arg Ala Arg Thr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val  
                                  260                    265                    270  
 Thr Val Ser Ser  
                                  275  
 <210> 47  
  
 <211> 276  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies  
 <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

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> Artificial Sequence

<220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 48

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

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

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

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

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

65                    70                    75                    80  
  
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Met  
                               85                    90                    95  
 Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
                               100                    105                    110  
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
                               115                    120                    125  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
                               130                    135                    140  
  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly  
 145                    150                    155                    160  
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Val Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly  
                               165                    170                    175  
 Ile Ile Phe Arg Leu Ser Ala Leu Gly Trp Thr Arg Gln Gly Pro Gly  
                               180                    185                    190  
 Lys Ala Arg Glu Trp Val Ala Gly Ile Asn Ser Asp Gly Thr Thr Asn  
                               195                    200                    205  
  
 Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala  
                               210                    215                    220  
 Lys Asn Thr Ile Tyr Leu His Met Asp Met Leu Lys Pro Glu Asp Thr  
 225                    230                    235                    240  
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Lys Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln  
                               245                    250                    255  
 Val Thr Val Ser Ser  
                               260  
 <210> 49  
 <211> 261  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220  
 ><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies  
 <400> 49

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Val Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Ile Phe Arg Leu Ser  
                   20                    25                    30  
 Ala Leu Gly Trp Thr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Ala Arg Glu Trp Val  
                   35                    40                    45  
 Ala Gly Ile Asn Ser Asp Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys  
  
                   50                    55                    60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu  
 65                    70                    75                    80  
 His Met Asp Met Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
                   85                    90                    95  
 Ser Gly Lys Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly  
                   100                    105                    110  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
  
                   115                    120                    125  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
                   130                    135                    140  
 Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro  
 145                    150                    155                    160  
 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr  
                   165                    170                    175  
 Ile Asn Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu  
  
                   180                    185                    190  
 Leu Val Val Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser  
                   195                    200                    205  
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met  
                   210                    215                    220  
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 225                    230                    235                    240  
 Cys Met Leu Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln

245                      250                      255

Val Thr Val Ser Ser

260

<210> 50

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1                      5                      10                      15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg Ile Asn

20                      25                      30

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

35                      40                      45

Ala Asp Ile Thr Ser Gly Gly Asn Ile Asn Tyr Ile Asp Ala Val Lys

50                      55                      60

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

65                      70                      75                      80

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

85                      90                      95

Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala Arg Thr

100                      105                      110

Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly

115                      120                      125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

130                      135                      140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

145                      150                      155                      160

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

165                      170                      175

Gly Ser Val Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Ile Phe Arg Leu

180 185 190  
 Ser Ala Leu Gly Trp Thr Arg Gln Gly Pro Gly Lys Ala Arg Glu Trp

195 200 205  
 Val Ala Gly Ile Asn Ser Asp Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val  
 210 215 220

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

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

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

<210> 51

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 51

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

115                                      120                                      125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

130                                      135                                      140

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro

145                                      150                                      155                                      160

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg

165                                      170                                      175

Ile Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gln Arg Glu

180                                      185                                      190

Leu Val Ala Asp Ile Thr Ser Gly Gly Asn Ile Asn Tyr Ile Asp Ala

195                                      200                                      205

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

210                                      215                                      220

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

225                                      230                                      235                                      240

Cys Asn Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala

245                                      250                                      255

Arg Thr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

260                                      265                                      270

<210> 52

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 52

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly Gly

1                                      5                                      10                                      15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn

20                                      25                                      30

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

35                                      40                                      45

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

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

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

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

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu  
 115 120 125

Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu  
 130 135 140

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn Ala Met Gly Trp  
 145 150 155 160

Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Val Arg Arg Thr  
 165 170 175

Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr  
 180 185 190

Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser  
 195 200 205

Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Met Leu Asp Asp Arg  
 210 215 220

Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 225 230 235

<210> 53  
 <211> 274  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies  
 <400> 53

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gly His Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val

260                                  265                                  270

Ser Ser

<210> 54

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 54

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly



Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 130 135 140  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
 145 150 155 160

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser  
 165 170 175  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Ala  
 180 185 190  
 Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala  
 195 200 205  
 Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys  
 210 215 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu  
 225 230 235 240  
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 245 250 255  
 Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala Tyr  
 260 265 270  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 275 280

<210> 56

<211> 281

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 56

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

275 280

<210> 57

<211> 279

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 57

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ser Asn			
	20	25	30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val			
	35	40	45
Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser			
	50	55	60
Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val			

65	70	75	80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
	85	90	95
Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp			
	100	105	110
Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly			
	115	120	125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly			

130	135	140	
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln			
145	150	155	160
Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg			
	165	170	175
Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Gly			
	180	185	190

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile

195 200 205

Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly

210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln

225 230 235 240

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

245 250 255

Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

260 265 270

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

275

<210> 58

<211> 274

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 58

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala

100                      105                      110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly  
 115                      120                      125  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 130                      135                      140  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
 145                      150                      155                      160  
  
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Glu Ser  
 165                      170                      175  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp Phe Lys Val  
 180                      185                      190  
 Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val Ala  
 195                      200                      205  
 Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Met His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly  
 210                      215                      220  
  
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
 225                      230                      235                      240  
 Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Val  
 245                      250                      255  
 Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val  
 260                      265                      270  
 Ser Ser

- <210> 59
- <211> 272
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 59  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ser Asn

20	25	30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val		
35	40	45
Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser		
50	55	60
Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val		
65	70	75
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
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
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> Artificial Sequence

<220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 60

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ser Asn

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser

                  50                    55                    60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp

                  100                    105                    110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

                  115                    120                    125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

                  130                    135                    140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln

145                    150                    155                    160

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg

                  165                    170                    175

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Gly

                  180                    185                    190

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile

                  195                    200                    205

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

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

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

Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala Tyr Trp Gly  
 260 265 270

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 275 280

<210> 61

<211> 281

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 61

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

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

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

Ala Asp Ile Thr Ser Gly Gly Asn Ile Asn Tyr Ile Asp Ala Val Lys

50 55 60

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

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

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

Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly

115 120 125  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 145 150 155 160  
 Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly  
 165 170 175  
 Gly Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ile

180 185 190  
 Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu  
 195 200 205  
 Val Ala Ala Arg Asp Arg Gly Gly Tyr Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val  
 210 215 220  
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Pro Thr Met Tyr  
 225 230 235 240  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

245 250 255  
 His Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly  
 260 265 270  
 Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 275 280

<210> 62  
 <211> 277  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies  
 <400> 62

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ser Asn  
 20 25 30  
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35                                  40                                  45  
 Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser  
 50                                  55                                  60  
 Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val  
 65                                  70                                  75                                  80  
  
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85                                  90                                  95  
 Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp  
 100                                  105                                  110  
 Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 115                                  120                                  125  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 130                                  135                                  140  
  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln  
 145                                  150                                  155                                  160  
 Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Thr  
 165                                  170                                  175  
 Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ile Asn Thr Met Gly  
 180                                  185                                  190  
 Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala Arg  
 195                                  200                                  205  
  
 Asp Arg Gly Gly Tyr Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe  
 210                                  215                                  220  
 Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Pro Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn  
 225                                  230                                  235                                  240  
 Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Ala Gly Thr  
 245                                  250                                  255  
 Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln Gly Thr Gln  
 260                                  265                                  270  
  
 Val Thr Val Ser Ser  
 275

<210> 63

<211> 279

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 63

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala

100                    105                    110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly

115                    120                    125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

130                    135                    140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu

145                    150                    155                    160

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser

165                    170                    175

Leu Thr Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ile Asn Thr

180                    185                    190

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

195                    200                    205

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

Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Pro Thr Met Tyr Leu Gln

225 230 235 240

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

Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln Gly  
 260 265 270

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 275

<210> 64

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 64

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly



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> Artificial Sequence

<220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 66

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser

50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Ala Gly Gly Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln

145 150 155 160

Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg

165 170 175

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn Ala Met Gly

180 185 190

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Val Arg Arg

195 200 205

Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe

210                      215                      220  
 Thr Ile Ser Ala Asp Ile Ala Lys Lys Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn  
 225                      230                      235                      240  
 Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Met Leu Asp Asp  
                             245                      250                      255  
  
 Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
                             260                      265                      270  
  
 <210> 67  
 <211> 274  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies  
 <400> 67  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr  
                             20                      25                      30  
  
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
                             35                      40                      45  
 Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val  
                             50                      55                      60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                             85                      90                      95  
  
 Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala  
                             100                      105                      110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly  
                             115                      120                      125  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
                             130                      135                      140  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu

145                                 150                                 155                                 160

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser

165                                 170                                 175

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Thr Ile Asn Ala

180                                 185                                 190

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

195                                 200                                 205

Arg Arg Thr Arg Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Gln Asp Ser Val Lys Gly

210                                 215                                 220

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

225                                 230                                 235                                 240

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

245                                 250                                 255

Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val

260                                 265                                 270

Ser Ser

<210> 68

<211> 277

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 68

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1                                 5                                 10                                 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ile Asn

20                                 25                                 30

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

35                                 40                                 45

Ala Ala Arg Asp Arg Gly Gly Tyr Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys

50                                 55                                 60

Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Pro Thr Met Tyr Leu  
 65                      70                      75                      80  
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His  
                          85                      90                      95  
 Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln  
                          100                      105                      110  
 Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
                          115                      120                      125  
  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
                          130                      135                      140  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val  
 145                      150                      155                      160  
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser  
                          165                      170                      175  
 Cys Val Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Gly Trp Phe  
                          180                      185                      190  
  
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp  
                          195                      200                      205  
 Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe  
                          210                      215                      220  
 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn  
 225                      230                      235                      240  
 Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Gly  
                          245                      250                      255  
  
 Ser Ser Trp Leu Ser Phe Pro Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln  
                          260                      265                      270  
 Val Thr Val Ser Ser  
                          275  
 <210> 69  
 <211> 279  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Sequences of multivalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 69

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ile Asn

20                    25                    30

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

35                    40                    45

Ala Ala Arg Asp Arg Gly Gly Tyr Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys

50                    55                    60

Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Pro Thr Met Tyr Leu

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln

100                    105                    110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115                    120                    125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

130                    135                    140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val

145                    150                    155                    160

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser

165                    170                    175

Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Met Gly Trp Phe

180                    185                    190

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp

195                    200                    205

Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr

210                    215                    220

Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser

225                    230                    235                    240  
 Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Lys Asp  
                          245                    250                    255  
 Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
                          260                    265                    270  
 Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
                          275

<210> 70

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> fr1

<400> 71

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Leu Ser Gly Arg Ile Gly Ser  
                          20                    25                    30

<210> 72

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 74

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

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

<210> 75

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 75

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

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

20 25 30

<210> 76

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 76

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Leu Ala

20 25 30

<210> 77

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 77

Lys Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ala Phe Asn

20 25 30

<210> 78

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 78

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ile Ile Phe Arg

20 25 30

<210> 79

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 79

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Glu

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp

                  20                    25                    30

<210> 80

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 80

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Ser Phe Arg

                  20                    25                    30

<210> 81

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 81

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Val Arg

                  20                    25                    30

<210> 82

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 83

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser

                  20                    25                    30

<210> 84

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> monovalent anti-CXCR2 Nanobodies

<400> 90

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ile Asn

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

Ala Ala Arg Asp Arg Gly Gly Tyr Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys

                  50                    55                    60

Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Pro Thr Met Tyr Leu

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln

                  100                    105                    110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

                  115                    120

<210> 91

<211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <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> Artificial Sequence  
 <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> Artificial Sequence  
 <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> Artificial Sequence  
 <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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 96

Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala

1                    5                    10

<210> 97

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 101

Trp Tyr Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala

1                    5                    10

<210> 102

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence  
 <220><223> FR2

<400> 104  
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala  
 1                    5                    10  
 <210> 105  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <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> Artificial Sequence  
 <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> Artificial Sequence  
 <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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 118

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu His  
 1                    5                    10                    15  
 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
                   20                    25                    30

<210> 119

<211

> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 120

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
 1                    5                    10                    15

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

<210> 121

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 124

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met Tyr Leu Gln  
 1                    5                    10                    15

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

<210> 125

<211

> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence  
 <220><223> FR3  
 <400> 128  
 Arg Phe Thr Ile Ala Arg Asp Asn Ile Leu Asn Thr Ala Tyr Leu Gln  
 1                   5                   10                   15  
 Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Tyr Asn Val  
                   20                   25                   30

<210> 129  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <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> Artificial Sequence  
 <220><223> FR3  
 <400> 130  
 Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Pro Thr Met Tyr Leu Gln  
 1                   5                   10                   15  
 Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Ala  
                   20                   25                   30

<210> 131  
 <211  
 > 11  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR4

<400> 131

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1                    5                    10

<210> 132

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR4

<400> 132

Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1                    5                    10

<210> 133

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR4

<400> 133

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1                    5                    10

<210> 134

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 134

Asp Tyr Ala Ile Gly

1                    5

<210> 135

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 135

Leu Ser Gly Met Ala

1                    5

<210> 136

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 136

Asn Tyr Ala Met Gly

1                    5

<210> 137

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 137

Arg Ser Ala Met Gly

1                    5

<210> 138

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 138

Tyr Tyr Thr Val Gly

1                    5

<210> 139

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 139

Tyr Tyr Val Met Ala

1                    5  
<210> 140  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> CDR1  
<400> 140

Leu Ser Ala Leu Gly

1                    5  
<210> 141  
<211> 5  
<212>  
> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> CDR1  
<400> 141

Phe Lys Val Met Gly

1                    5  
<210> 142  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> CDR1  
<400> 142

Ile Asn Thr Met Gly

1                    5  
<210> 143  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> CDR1  
<400> 143

Ile Asn Thr Met Gly

1                    5  
<210> 144

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 144

Ser Leu Ser Met Gly

1 5

<210> 145

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 145

Asp Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 146

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 146

Ser Asn Ala Met Gly

1 5

<210> 147

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 147

Ile Asn Ala Met Gly

1 5

<210> 148

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 148

Ile Asn Ala Met Gly

1                   5

<210> 149

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 149

Ile Asn Ala Met Gly

1                   5

<210> 150

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 150

Ile Arg Ala Met Gly

1                   5

<210> 151

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 151

Ile Asn Thr Met Gly

1                   5

<210> 152

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 154

Cys Ile Ser Gly Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 155

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 158

Cys Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1	5	10	15
Gly			

<210> 159

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223>

> CDR2

<400> 163

Asp Ile Thr Ser Gly Gly Asn Ile Asn Tyr Ile Asp Ala Val Lys Gly

1                    5                    10                    15

<210> 164

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 168

Val Ile Thr Ser Gly Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1                    5                    10                    15

<210> 169

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 173

His Thr Ser Ser Tyr Ser Asn Trp Arg Val Tyr Asn Asn Asp Tyr

1                    5                    10                    15

<210> 174

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 175

Gly Arg Tyr

1

<210> 176

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 176

Ser Arg Thr Asn Pro Lys Pro Asp Tyr

1                    5

<210> 177

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 178

Asp Arg Arg Thr Asp Cys Lys Lys Gly Arg Val Gly Ser Gly Ser

1                    5                    10                    15

<210> 179

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 180

Gly Lys Tyr

1

<210> 181

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 181

Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr

1                    5

<210> 182

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 183

Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp Thr Gln Arg Ala Arg Thr Gly

1                    5                    10                    15

Asn Tyr

<210> 184

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 187

Asp Asp Arg Gly Gly Val Tyr

1                   5

<210> 188

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 188

Glu Thr Val Val Gly Ala Val Tyr

1                   5

<210> 189

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 189

Asp Gly Gly Pro Ser Gln Asn Tyr

1                   5

<210> 190

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 190

Glu Thr Leu Arg Arg Asn Tyr

1                   5

<210> 191

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY

<400> 192

gaggtgcagc tggtagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctactgga tgtattgggt ccgtcaggct 120  
 ccaggaagg ggctcgactg ggtctcagct attaatgctg gtggtgatag cacatactat 180  
 gcagaccccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acaacaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcagatga acagcctgaa acctgaggac acggccctgt attactgtgc gaccgtacga 300

ggcacagctc gtgacttggg ctactggggc caggggacc aggtcacctc ctctca 357

<210> 193

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY

<400> 193

gaggtgaagc tggtagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc 60  
 tcctgtgcac tccttgggag gatcggcagt atcaacgcca tgggctggta tcgccaggtt 120  
 tcaggacaac agcgcgagtt ggtcgcagta agcaggagcg gaggtagcac agacattgct 180  
 gactcctgga agggccgatt caccatctcc agagacaacg gcaagaacac agtgtatctg 240

cagatggaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt actgttatgc tcatacttca 300

agctatagta attggcgagt ctacaataac gactactggg gccaggggac ccaggtcacc 360

gtctctca 369

<210> 194

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY  
 <400> 194  
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactt 60  
 acctgtgcag cctctggacg catcggcact atcaatgcca tgggctggta cgccaggct 120  
  
 ccaggaagc agcgcgagtt ggtcgcagtt attactagtg gtggtaggat agactatgca 180  
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac ggtgtatctg 240  
 caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt actataatgt agaaacggta 300  
 gtgggtgccg tctactgggg ccaggggacc caggtcaccg tctcctca 348  
 <210> 195  
 <211> 348  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY  
 <400> 195  
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc 60  
  
 tctgtgcag cctctggaag gatgggcaat atcaatgcca tgggctggta tcgccaggct 120  
 ccaggaagg agcgcgagtt ggtcgcaaaa attactaggg gtggtgcgat aacctatgca 180  
 gactccgtga agggccgatt caccatcgcc agagacaata ttctgaacac ggcgtatctg 240  
 caaatgaacg acctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt attataatgt agatgggggg 300  
 cccagtcaaa actactgggg ccaggggacc caggtcaccg tctcctca 348  
 <210> 196  
 <211> 378  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY  
 <400>  
 > 196  
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc 60  
 tctgtgcag cctctggatt cactttcgat gattatgcca taggctggtt cgccaggcc 120  
 ccaggaagg agcgtgagag ggtctcatgt attagtggta gtgatggtag cacatactat 180  
 gcagactccg tcaagggccg attcaccatc tccagtgaca acgccaagaa cacggtgtat 240  
 ctgcaaatga acaacctgaa acccgaggac acggccgttt attattgtgc agcatattgg 300  
 ggactaacgc tcaggctatg gatgcccc caccggtatg actactgggg ccaggggacc 360

caggtcacgc tctctca 378

<210> 197  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY  
 <400> 197

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc tctgagcctc 60  
 tcctgtgcag cctctggact tatcttcaga ctcaaggcca tggcctggta tcgccaggct 120  
 ccggggaggc agcgcgagtg ggtcgcagtg cttaccaag atggtaccct aactatgca 180  
 gaccctgta agggccgatt caccatctcc agaacaacg ccgagaacac gtggtatctg 240  
 caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacaca gccatctatt actgtaatac gggccgttac 300

tggggccagg ggaccaggt caccgtctcc tca 333

<210> 198  
 <211> 345  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY  
 <400> 198

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc actgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggaac catcgccagc atcagagcca tgggctggta ccgccaggct 120  
 ccagggaagc agcgcgagtt ggtcgcattg attactagta ctggtaggat aaactatgca 180  
 gactcctgta agggccgatt caccattgga agagacaatg ccaagaacac ggcgtatctg 240

caaatgaaca acctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt actataatat cgaaacacta 300  
 cgacgtaact actggggcca ggggacccag gtcaccgtct cctca 345

<210> 199  
 <211> 354  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY  
 <400> 199

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctggggggtc tctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggacg cacctttagt aactatgcca tgggctggtt cgccaggcc 120  
 acaggaagg agcgtgagtt tgtagcagct attaacaaga gtggtgggaa cacacactat 180  
  
 gcagctccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacggtgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgaa acctagggac acggccgttt attactgtgc agcgtcgcgg 300  
 actaaccta agcctgacta ctggggccag gggaccagg tcaccgtctc ctca 354  
 <210> 200  
 <211> 366  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY  
 <400> 200  
  
 gaggtgcagc tgggtgagtc tgggggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggacg ctcttcagt cgcagtgcc tgggctggct cgccaggct 120  
  
 ccaggaagg agcgtgaatt tgtagcaggt attagctggg gtggtgataa ctcatactat 180  
 gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa caccgtgtct 240  
 ctacaaatga acagcctgaa acctcaggac acggccgttt attactgtgc agcaagatac 300  
 cggggaggcg cggcagtagc tggttgggag tactggggcc aggggacca ggtcacctgc 360  
 tcctca 366  
 <210> 201  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY  
 <400>  
 > 201  
  
 gaggtgcagc tgggtgagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctgggggctc tctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctccggatc cactttggcc tattataccg taggctggtt cggccgggcc 120  
 ccaggaagg agcgcgagg gatctcatgt attagtagta gtgatgtag cacatactat 180  
 gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa tacggtgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc ggctgacaga 300  
 cgtaccgact gtaaaaagg tagagtcggt tctggttct ggggcccagg gaccaggtc 360  
 accgtctcct ca 372

<210> 202  
 <211> 375  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY  
 <400> 202  
 aaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggg ctggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctccggagc cgccttcaat tactatgtca tggcctggtt ccgccaggct 120  
 caaggaagg agcgtgagtt tgtagcagct attagcacgc gtggtagtat gacaaagtat 180  
 tcagactccg tgcagggccg gttcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgggtgat 240  
 ctgcatatga acagcctgaa acctgaggat acggccgttt attactgtgc agcagaccct 300

cgcggcagta gctggtcatt ttcgtccggg ggttatgact actggggcca ggggaccag 360  
 gtcaccgtct cctca 375

<210> 203  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY  
 <400> 203  
 gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctgggggctc tgtgagactc 60  
 tcctgtgtag cctctggaat catcttcaga ctcagtgctt tgggttgac acgccagggt 120  
 ccaggaagg cgcgcgagtg ggtcgcaggt attaacagtg atggtacgac caactacgcc 180

gaccccgta agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac gatatatctg 240  
 cacatggaca tgctgaaacc tgaggatacg gccgtctatt actgtgcctc cggaaagtac 300  
 cggggccagg ggacccaggt caccgtctcc tca 333

<210> 204  
 <211> 345  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY  
 <400> 204  
 gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggaag caccttcgat ttcaaagtca tgggctggta cgccagcct 120  
  
 ccaggaagc agcgcgaggg ggtcgcagcg attaggctta gtgtaacat gcactatgca 180  
 gagtccgtga agggccgatt caccatctcc aaagccaacg ccaagaacac agtgtatctg 240  
 caaatgaaca gcctgagacc tgaggacacg gccgtctatt actgtaaggt gaacattcgg 300  
 ggccaggact actggggcca ggggaccag gtcaccgtct cctca 345  
 <210> 205  
 <211> 360  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY  
 <400> 205  
  
 gaggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctggggggtc tctgacgctc 60  
  
 tcctgtgcag tctctggaag ctcttcaga atcaatacca tgggctggta cggccgggct 120  
 ccaggaagc agcgcgagtt ggtcgcagct cgtgatagag gtggttacat aaactatgta 180  
 gattccgtga agggccgatt caccgtctcc agagacaacg ccaagcccac aatgtatctg 240  
 caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt attgtcatgc cgggacccaa 300  
 gatcggagcg gtcggaattt cgaccactgg ggccagggga cccaggtcac cgtctcctca 360  
 <210> 206  
 <211> 378  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY  
 <400>  
 > 206  
 gaggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60  
 tcctgtgtag cctctggaag catcgtcaga attaatacca tgggctggta cggccagact 120  
 ccaggaagc agcgcgagtt ggtcgcagat attaccagtg gtgtaacat aaactatata 180  
 gacgccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaaca ccaagaacac ggtgtatctg 240  
 caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt actgtaatgc agagatcgtt 300  
 gttctggtgg gagtttgac ccagcgtgcg cggaccggca actactgggg ccaggggacc 360  
 caggtcaccg tctcctca 378  
  
 <210> 207

<211> 372  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY  
 <400> 207  
 gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggagga ttggtgcagc ctgggggctc tctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggacg cacgttcagt agcttgcca tgggctggtt cgcaggct 120  
 ccgggaagg agcgtgcctt ttagcagcg ctactcga atgggtgta cagatactat 180  
 gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagacg tcgccaagaa gacctatat 240  
 ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggcgtct attactgtgc agcagatagt 300  
  
 cttagtggta gtgactactt aggaaccaac ctgactact ggggccaggg gaccaggtc 360  
 accgtctcct ca 372  
 <210> 208  
 <211> 372  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY  
 <400> 208  
 gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggacg cacgttcagt gactatgcca tgggctggtt cgcaggct 120  
 ccagggaagg agcgtgagtt ttagcagct attacgtgga atgggtgtag agtattttat 180  
  
 actgcctccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgatgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggcgttt attactgtgc agcagataaa 300  
 gacagacgta ctgactatct agggcaccct gttgcctact ggggccaggg gaccaggtc 360  
 accgtctcct ca 372  
 <210> 209  
 <211> 366  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY  
 <400> 209  
 gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggagga ttggtgcagc ctgggggctc tctgagactc 60

tctgtgtag cctctggacg catcttcagt agcaatgcca tgggctggtt cgccaggct 120  
 ccaggaagg agcgtgagtt ttagcggcc attacctgga ggagtggcgg tagcgcgtac 180  
 tatgcagact ccgcgaaggg ccgattcacc atctccagag acaacgcaa gaacacggtg 240  
 tatttgcaaa tgaacagcct gaaacctgag gacacggccg tttattattg tgcagctggt 300  
 ggtagttcct ggtaagttt tccgccggac tactggggcc aggggaccca ggtcacctgc 360  
 tctca 366

<210> 210

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY

<400> 210

gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggagag ttggtgcagc cgggggggctc tctgagactc 60  
 tctgtgcag cctctggaag catcttaact atcaatgcca tgggctggta cgccaggct 120  
 ccaggaagc agcgcgagtt gtagtccgt aggactaggg gtggtagtagc aacgtatcaa 180  
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc gcagacattg ccaagaaaac gatgtatctc 240  
 caaatgaaca gcctgaaacc tgaagacacg gccgtctatt actgtatgct agatgaccgt 300  
 ggggtgtct actgggtca ggggaccag gtcaccgtct cctca 345

<210> 211

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NUCLEIC ACID ENCODING MONOVALENT NANOBODY

<400> 211

gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggagc ttggtgcagg ctggggggctc tctgacgctc 60  
 tctgtgcag tctctggaag caccttcaga atcaatacca tgggctggta cggcgggct 120  
 ccaggaagc agcgcgagtt ggtcgcagct cgtgatagag gtggttacat aaactatgta 180  
 gattccgtga agggccgatt caccgtctcc agagacaacg ccaagcccac aatgtatctg 240  
 caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt attgtcatgc cgggacccaa 300  
 gatcggacgg gtcggaattt cgaccgctgg ggccagggga cccaggtcac cgtctcctca 360

<210> 212

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 212

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

                  20                    25                    30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

                  35                    40                    45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

                  85                    90                    95

Ala Lys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

                  100                    105

<210>

213

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequences of sequence-optimised variants

<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



<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequences of sequence-optimised variants

<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> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequences of sequence-optimised variants

<400> 216

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp Phe Lys

20                    25                    30

Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val

35                    40                    45

Ala Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Arg His Tyr Ala Glu Ser Val Lys



<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequences of sequence-optimised variants

<400> 218

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val Phe Tyr Thr Ala Ser Val

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Ala Ala Asp Lys Asp Arg Arg Thr Asp Tyr Leu Gly His Pro Val Ala

100                    105                    110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115                    120

<210> 219

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequences of sequence-optimised variants

<400> 219

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ile Asn

20                    25                    30

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

35 40 45  
Ala Ala Arg Asp Arg Gly Gly Tyr Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys

50 55 60  
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Pro Thr Met Tyr Leu

65 70 75 80  
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His

85 90 95  
Ala Gly Thr Gln Asp Arg Thr Gly Arg Asn Phe Asp Arg Trp Gly Gln

100 105 110  
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 220

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEPTIDE LINKER

<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> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequences of sequence-optimised biparatopic

<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



<210> 222

<211> 274

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequences of sequence-optimised biparatopic

<400> 222

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp Phe Lys

                  20                    25                    30

Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val

                  35                    40                    45

Ala Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Arg His Tyr Ala Glu Ser Val Lys

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

                  100                    105                    110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

                  115                    120                    125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

                  130                    135                    140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly

145                    150                    155                    160

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly

                  165                    170                    175

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

                  180                    185                    190

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp Asn Gly Gly Arg Val

                  195                    200                    205

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

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

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

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

Ser Ser

<210> 223

<211> 277

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequences of sequence-optimised biparatopic

<400> 223

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Gly  
 245 250 255

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

Val Thr Val Ser Ser  
 275

<210> 224

<211> 279

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequences of sequence-optimised biparatopic

<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



<211> 422

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequences of sequence-optimised bipolaratopic

<400> 225

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp Phe Lys

                  20                    25                    30

Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val

                  35                    40                    45

Ala Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Arg His Tyr Ala Glu Ser Val Lys

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

                  100                    105                    110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

                  115                    120                    125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

                  130                    135                    140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly

145                    150                    155                    160

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly

                  165                    170                    175

Arg Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly

                  180                    185                    190

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Trp Arg Ser Gly Gly Ser

                  195                    200                    205

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 290 295 300

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 305 310 315 320

Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 325 330 335

Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 340 345 350

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala  
 355 360 365

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr  
 370 375 380

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val  
 385 390 395 400

Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr  
 405 410 415

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 420

<210> 226  
 <211> 426  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequences of sequence-optimised biparatopic

<400> 226

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp Phe Lys

                  20                    25                    30  
 Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Gly Val

                  35                    40                    45  
 Ala Ala Ile Arg Leu Ser Gly Asn Arg His Tyr Ala Glu Ser Val Lys

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

65                    70                    75                    80  
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys

                  85                    90                    95  
 Val Asn Ile Arg Gly Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

                  100                    105                    110  
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

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

                  130                    135                    140  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly

145                    150                    155                    160  
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly

                  165                    170                    175  
 Ser Ile Val Arg Ile Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly

                  180                    185                    190  
 Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Asp Ile Thr Ser Gly Gly Asn Ile Asn

                  195                    200                    205  
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser

                  210                    215                    220  
 Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr

225                    230                    235                    240  
 Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu Ile Val Val Leu Val Gly Val Trp  
                          245                    250                    255  
 Thr Gln Arg Ala Arg Thr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
                          260                    265                    270  
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
                          275                    280                    285  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
                          290                    295                    300  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly  
 305                    310                    315                    320  
 Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
                          325                    330                    335  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro  
                          340                    345                    350  
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp  
                          355                    360                    365  
 Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
                          370                    375                    380  
 Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu  
  
 385                    390                    395                    400  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser  
                          405                    410                    415  
 Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                          420                    425  
 <210> 227  
 <211> 424  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> amino acid sequences of sequence-optimised biparatopic  
 <400> 227  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

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

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

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 290 295 300

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu  
 305 310 315 320

Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe  
 325 330 335

Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
 340 345 350

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu  
 355 360 365

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala  
 370 375 380

Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr  
 385 390 395 400

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln  
 405 410 415

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 420

<210> 228

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequences of sequence-optimised biparatopic

<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



<210> 231

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 231

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Asp

                  20                    25                    30

<210> 232

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 233

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser

                  20                    25                    30

<210> 234

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 244

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Pro Thr Met Tyr Leu Gln  
 1                    5                    10                    15

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

<210> 245

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 246

Thr Tyr Trp Met Tyr  
 1                    5

<210> 247

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 248

Ile Asn Ala Met Gly

1

5