

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 687 654**

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

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2013 PCT/IB2013/053711**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13168108**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2013 E 13742049 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018 EP 2847221**

(54) Título: **Polipéptidos de enlace biparatópico para CXCR2 y sus usos**

(30) Prioridad:

09.05.2012 US 201261644582 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.10.2018

(73) Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

(72) Inventor/es:

**BROWN, ZARIN;
BRADLEY, MICHELLE;
CHARLTON, STEVEN JOHN;
VAN HEEKE, GINO ANSELMUS;
CROMIE, KAREN;
DOMBRECHT, BRUNO;
STEFFENSEN, SOREN;
BAUMEISTER, JUDITH;
BOUCHE, MARIE-PAULE;
BOUTON, CARLO;
BUYSE, MARIE-ANGE;
SNOECK, VEERLE y
STAELENS, STEPHANIE**

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 687 654 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de enlace biparatópico para CXCR2 y sus usos

La presente invención se refiere a polipéptidos dirigidos contra, o que se enlazan específicamente a, el receptor de quimiocina CXCR2, y en particular a los polipéptidos capaces de modular la transducción de señales a partir del CXCR2. La invención también se refiere a ácidos nucleicos, vectores y células huésped capaces de expresar los polipéptidos de la invención, a composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos, y al uso de estos polipéptidos y composiciones para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), y de otras enfermedades que involucren un funcionamiento aberrante del CXCR2.

Antecedentes a la invención

10 La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) es un término utilizado para describir un número de trastornos caracterizados por la limitación del flujo de aire que en la mayoría de los casos es progresivo y está asociado con una respuesta inflamatoria anormal del pulmón a las partículas nocivas, con destrucción del parénquima pulmonar, que da como resultado una declinación de la función de las vías respiratorias (Barnes PJ et al., 2003, Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur. Respir J.* 22, 672-688; Barnes PJ et al., 15 2004, Mediators of Chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol. Rev.* 56, 515-548). Aunque los factores genéticos y del medio ambiente contribuyen al desarrollo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), el fumar es la causa más importante, conduciendo las infecciones pulmonares recurrentes a una declinación progresiva de la función pulmonar. El dejar de fumar reduce el progreso de la enfermedad solamente si se aplica oportunamente, y tiene poco efecto después de que se presentan los síntomas significativos. Varias condiciones co- 20 patológicas están asociadas con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), tales como asma, enfermedad cardiovascular, depresión y consunción muscular (Mannino DM y Buist S, 2007 Global burden of COPD: risk factors, prevalence and future trends. *Lancet*, 370, 765-773).

25 Las quimiocinas predominan entre los factores quimiotácticos y, por consiguiente, tienen una función clave en la orquestación de la inflamación crónica en los pulmones con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y su amplificación adicional durante las exacerbaciones agudas. La actividad biológica de las quimiocinas IL-8 (CXCL8), GRO α (CXCL1), y ENA-78 (CXCL5) es mediada por dos poblaciones de receptores de superficie celular CXCR1 y CXCR2, que están presentes en los leucocitos y en muchos otros tipos de células a través de todo el cuerpo. La migración de los leucocitos es mediada primordialmente a través del CXCR2 que se enlaza a varios ligandos, incluyendo IL-8, GRO α , β , y, ENA78, y GCP-2. En contraste, CXCR1 es activado selectivamente por IL-8, y hasta un menor grado por GCP-2. Sigue siendo poco claro si la quimiotaxis de los neutrófilos humanos *in vivo* es mediada por uno o ambos receptores.

30 El CXCR2 comparte el 78 % de homología al nivel de los aminoácidos con el CXCR1, y ambos receptores están presentes en los neutrófilos con diferentes patrones de distribución. La expresión del CXCR2 en una variedad de células y tejidos, incluyendo células-T CD8+, NK, monocitos, mastocitos, células epiteliales, endoteliales, de músculo liso, y una gran cantidad de tipos de células del sistema nervioso central, sugiere que este receptor puede tener un papel funcional amplio tanto bajo condiciones constitutivas como en la patofisiología de un número de enfermedades agudas y crónicas. La activación del CXCR2 estimula el acoplamiento del receptor con la familia de proteínas de enlace de nucleótido de guanina Gi; esto a su vez estimula la liberación de los fosfatos de inositol intracelulares, el aumento de Ca $^{2+}$ intracelular, y, mediante los mecanismos dependientes de ERK1/2, la fosforilación de las 35 proteínas intracelulares asociadas con la migración celular dirigida al gradiente de quimiocina. Una vez activado, el CXCR2 se fosforila y se internaliza rápidamente a través de los mecanismos dependientes de arrestina/dinamina, los cual da como resultado la desensibilización del receptor. Este proceso es similar a aquél observado con la mayoría de otros GPCRs, pero la velocidad y el grado de internalización de CXCR2 inducida por el agonista, es mayor de lo que se ve con el CXCR1 (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).

40 IL-8 se ha implicado durante mucho tiempo como un mediador de la inflamación neutrofílica en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) (Keatings VM et al., 1996, Differences in IL-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with COPD and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153, 530-534; Yamamoto C et al., 1997 Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest*, 112, 505-510). En las 45 biopsias de las vías respiratorias bronquiales, las vías respiratorias pequeñas, y el parénquima pulmonar de los pacientes con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), hay una infiltración de las células-T y mayores números de neutrófilos, en particular en el lumen de las vías respiratorias (Hogg JC et al., 2004, The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Eng. J. Med.* 350, 2645-2653). Los neutrófilos aumentan en los pulmones de los pacientes con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), y esto se correlaciona con el grado de gravedad de la enfermedad (Keatings VM et al., 1996, Differences in IL-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with COPD and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153, 530-534). En adición, se elevan los niveles de TNF α en el esputo de los pacientes con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y esto induce la IL-8 a partir de las células epiteliales de las vías respiratorias (Keatings). 50 La concentración de GRO α es notoriamente elevada en el esputo inducido y en el fluido del lavado alveolar

bronquial (BAL) de los pacientes con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), comparándose con los fumadores normales y los no fumadores (Traves SL et al. 2002, Increased levels of the chemokines GRO α and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax*, 57, 50-59; Pesci A. et al., 1998, Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with COPD. *Eur Respir J.* 12, 380-386). GRO α es secretado por los macrófagos alveolares y las células epiteliales de las vías respiratorias en respuesta a la estimulación del TNF α , y activa selectivamente el CXCR2, el cual es quimiotáctico para los neutrófilos y los monocitos. Hay un aumento en la respuesta quimiotáctica de los monocitos al GRO α en los pacientes con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), el cual podría estar relacionado con el aumento en la rotación o en el reciclaje del CXCR2 en estas células (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). La infección pulmonar viral y bacteriana con frecuencia da como resultado severas exacerbaciones en los pacientes con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), la cual se caracteriza por mayores números de neutrófilos en las vías respiratorias (Wedzicha JA, Seemungal TA., 2007, COPD exacerbations: defining their cause and prevention, *Lancet* 370 (9589): 786-96). Las biopsias bronquiales de los pacientes con exacerbaciones severas y agudas de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) tienen cantidades significativamente incrementadas de expresión del ARNm de ENA-78, IL-8 y CXCR2 (Qiu Y. et al., 2003, Biopsy neutrophilia, neutrophil chemokine and receptor gene expression in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 168, 968-975), y el esputo tiene mayores recuentos de neutrófilos (Bathoorn 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) sugiriendo una función potencial para este receptor tanto en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) como en las exacerbaciones severas de esta enfermedad. El aumento en la expresión del ARNm de CXCR2 está presente en las muestras de biopsias bronquiales, el cual se correlaciona con la presencia de neutrófilos en el tejido (Qiu 2003). ENA-78 se deriva predominantemente a partir de las células epiteliales, y hay un notorio aumento en la expresión de ENA-78 en las células epiteliales durante las exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) (Qiu 2003). Debido a que aumentan las concentraciones de IL-8, GRO α y ENA-78 en las vías respiratorias con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), y los tres ligandos señalizan a través del CXCR2, el bloqueo de este receptor común con antagonistas selectivos sería una estrategia antiinflamatoria efectiva en esta enfermedad.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) evoluciona lentamente y de una manera progresiva, y el progreso de la enfermedad se estima tradicionalmente con las pruebas de la función pulmonar, tales como las medidas espirométricas de volumen de expiración forzada (FEV1). Los pacientes con <50 % de FEV1 predicho, se clasifican como graves. La función pulmonar está estrechamente relacionada con el índice de mortalidad, tanto como que casi el 35 % de los pacientes con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) grave mueren de la enfermedad dentro de 12 años, comparándose con solamente el 5 % de los pacientes leves a moderados. La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) es la cuarta causa de muerte en el mundo (World Health Organization [Organización Mundial de la Salud] (WHO), *World Health Report*, Ginebra, 2000. Disponible en URL: http://www.who.int/whr/2000/en/whr00_annex_en.pdf), y se pueden predecir más incrementos en su prevalencia y mortalidad en las próximas décadas (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). Las exacerbaciones son un factor clave en la espiral hacia abajo de la mala salud, y son en gran parte responsables de la gran mayoría de admisiones en hospitales por la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) (BTS (British Thoracic Society), 2006, Burden of Lung Disease Report, 2^a Edición, http://www.brit-thoracic.org.uk/Portals/0/Library/BTS%20Publications/burden_of_lung_disease2007.pdf). Los índices anuales promedio fueron de 2.3 para las exacerbaciones definidas por los síntomas, y de 2.8 para las exacerbaciones definidas por el cuidado de la salud (O'Reilly JF, Williams AE, Holt K et al., 2006, Prim Care Respir J. 15(6): 346-53). El diagnóstico oportuno y el mejor manejo de las exacerbaciones de los pacientes, así como la mejor prevención, ayudarían a reducir la tensión que implican estas admisiones sobre los recursos ya estirados. Los tratamientos disponibles para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) son principalmente paliativos, y no existen terapias disponibles que detengan la declinación de la función pulmonar o la destrucción progresiva de las vías respiratorias asociada con la enfermedad. Los tratamientos actuales, tales como los broncodilatadores β -adrenérgicos de corta y larga acción, los anticolinérgicos inhalados (antagonistas muscarínicos), y los corticosteroides inhalados, se utilizan para tratar los síntomas y las exacerbaciones de la enfermedad. Una limitación importante con la terapia con corticosteroides actual es que se hacen inefectivos a medida que los pacientes muestran resistencia a los corticosteroides, inactivando la acción antiinflamatoria de estos fármacos. Claramente, existe todavía una enorme necesidad médica insatisfecha de fármacos novedosos que prevengán el progreso de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD). Los antagonistas de los receptores de quimiocina son un planteamiento atractivo para la terapia de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), debido a que el tráfico de las células inflamatorias en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) es orquestado por múltiples quimiocinas, de modo que el bloqueo de los receptores de quimiocina con antagonistas de LMW podría ser una estrategia antiinflamatoria efectiva en esta enfermedad. Una característica crucial en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) es una amplificación de la respuesta inflamatoria que se ve en los fumadores normales, de modo que el objetivo de la terapia no es suprimir la infiltración de las células inflamatorias completamente, sino reducirla hasta los niveles que se ven en los fumadores normales sin la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD). Al actuar de una manera específica, el anti-CXCR2 evitaría la inmunosupresión general asociada con los esteroides - la conservación de la actividad del CXCR1 permitiría la activación de los neutrófilos de la línea basal, importante para la defensa del huésped en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y en FC. La mayoría de los fármacos para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica

(COPD) se administran actualmente mediante inhalación para reducir los efectos secundarios sistémicos; sin embargo, debido a que los antagonistas de quimiocina actúan sobre los receptores expresados en las células inflamatorias circulantes, la administración sistémica sería óptima. Esto proporcionaría una forma eficiente de llegar a las vías respiratorias pequeñas y al parénquima pulmonar, los cuales son afectados en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).

Los receptores de quimiocina, en contraste con las citoquinas y los receptores de interleucina, pertenecen a la super-familia altamente elaborable en fármacos de los 7TM-GPCRs. A pesar de esto, los primeros intentos por encontrar antagonistas potentes se encontraron con más dificultades de lo que se anticipaba basándose en la experiencia con los GPCRs que tienen pequeños ligandos de amina biogénicos o peptídicos. Los esfuerzos en los programas de descubrimiento de fármacos de molécula pequeña que se enfocan en los antagonistas de los receptores de quimiocina, empezaron a entender progresivamente las idiosincrasias de los receptores de quimiocina y los elementos estructurales requeridos para que las moléculas pequeñas actúen como antagonistas. Es interesante que la diversidad estructural de los antagonistas de los receptores de CC-quimiocina, como son representados por el número de series químicas fundamentalmente distintas identificadas, es considerablemente más alta que para los antagonistas de los receptores de CXC-quimiocina, lo cual sugiere que la dificultad relativa de encontrar los antagonistas puede ser diferente entre las dos clases de receptores.

Los receptores de quimiocina en general han probado ser objetivos difíciles de antagonizar, y se ha necesitado un enorme esfuerzo para identificar antagonistas de CXCR2 selectivos y potentes. El primer antagonista de CXCR2 de bajo peso molecular se describió en 1998, y desde entonces se ha desarrollado un número de antagonistas de CXCR2 aloestéricos no competitivos, varios de los cuales han progresado ahora hasta estudios clínicos. No obstante, existe claramente una necesidad de mejores y más potentes antagonistas de la función del CXCR2.

Las moléculas de la clase de inmunoglobulina han visto una enorme expansión en su utilidad clínica durante los últimos diez años más o menos. Su especificidad para un objetivo y la capacidad para diseñarlas empleando las técnicas recombinantes, proporciona un enorme potencial para desarrollar un tratamiento altamente dirigido para la enfermedad. Muchos tipos de moléculas de inmunoglobulina y de moléculas de inmunoglobulina modificadas están potencialmente disponibles para diseñarse adecuadamente, incluyendo los anticuerpos de cuatro cadenas convencionales, los fragmentos Fab y F(ab)2, los anticuerpos de un solo dominio (D(ab)s), los Fvs de una sola cadena, y los nanocuerpos. Éstos se discutirán adicionalmente en la presente en relación con la invención, la cual se refiere a los polipéptidos construidos para dirigirse contra al menos dos epítopos del CXCR2.

El documento WO 2009/138519 divulga nanocuerpos biparatópicos específicos para GPCRs, sin embargo, no divulga nanocuerpos biparatópicos con las propiedades de la presente invención

Por consiguiente, es un objeto de la invención proporcionar un nuevo medio de prevención o tratamiento del trastorno pulmonar obstructivo crónico o COPD, y de otras enfermedades asociadas con un funcionamiento aberrante del receptor de quimiocina CXCR2.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar un medio de tratamiento o prevención de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y de otras enfermedades asociadas con un funcionamiento aberrante del CXCR2 que sea una inmunoterapia.

Es un objeto todavía adicional de la invención proporcionar un polipéptido que comprenda regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de inmunoglobulina, el cual sea un antagonista de la transducción de señales del CXCR2.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un polipéptido que comprende al menos dos dominios de enlace al antígeno de inmunoglobulina, cuyo polipéptido se dirige contra, o se enlaza a, el receptor de quimiocina CXCR2, en donde el primer dominio de enlace al antígeno está comprendido dentro de un primer dominio V_{HH} o fragmento del mismo a partir de una sola cadena pesada de un anticuerpo de cadena pesada derivado a partir de un camélido, o es una variante humanizada, del mismo, y dicho segundo dominio de enlace al antígeno está comprendido dentro de un segundo dominio V_{HH} o fragmento del mismo a partir de una sola cadena pesada de un anticuerpo de cadena pesada derivado a partir de un camélido, o es una variante humanizada del mismo, y en donde el término C del polipéptido comprende una extensión de la secuencia de los dominios de enlace al antígeno de al menos un residuo de aminoácido adicional; teniendo el polipéptido una de las siguientes estructuras:

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

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

en donde, si FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 comprende el primer dominio de enlace al antígeno, entonces FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 comprende el segundo dominio de enlace al antígeno, y si FR1-CDR1-FR2-

5 CDR2-FR3-CDR3-FR4 comprende el segundo dominio de enlace al antígeno, entonces FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 comprende el primer dominio de enlace al antígeno, el HLE es una unidad de enlace que proporciona un aumento de la vida media *in vivo*, y el EXT es una extensión C-terminal seleccionada a partir de A, AA, AS, AST, ASTKP o GGGS; y en donde el primer dominio de enlace al antígeno reconoce un primer epítopo en CXCR2 y es capaz de unirse a un péptido lineal que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID No. 7 y en 10 donde dicho segundo dominio de enlace al antígeno se une a un epítopo dentro de los bucles externos de CXCR2 humano (residuos de aminoácido 106-120, 184-208 y 274-294 de SEQ ID No. 1).

El polipéptido preferido de la invención es biparatópico. Tal como se usa aquí, el término "biparatópico" significa que un polipéptido comprende dos dominios de enlace al antígeno que reconocen dos epítopos diferentes en el mismo objetivo de proteína. Sin embargo, los polipéptidos que son multiparatópicos que contienen dominios de enlace al antígeno que reconocen tres, cuatro o más epítopos en la misma proteína objetivo, están abarcados dentro del alcance de la invención, así como polipéptidos que son a la vez bi o multiparatópicos y multivalentes, es decir, que tienen también dominios de enlace al antígeno que reconocen una o más proteínas objetivo.

15 En los polipéptidos preferidos de la invención, una secuencia de aminoácidos que comprende el primer dominio de enlace al antígeno y la secuencia de aminoácidos que comprende el segundo dominio de enlace al antígeno se unen mediante una región elazante. Como se analiza con más detalle en este documento, el enlazador puede ser o no de origen inmunoglobulínico, pero es preferiblemente un péptido.

20 Un dominio variable único de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos VHH o un fragmento o variante del mismo, a partir de un anticuerpo de cadena pesada única del tipo obtenible a partir de camélidos se puede denominar aquí en la alternativa, como un "dominio VHH" o fragmento del mismo o como un "Nanocuerpo". 25 Debe tenerse en cuenta que Nanobody®, Nanobodies® y Nanoclone® son marcas registradas de Ablynx N.V.

Los fragmentos o las variantes del nanocuerpo biparatópico preferido anterior están abarcados por la invención, incluyendo las realizaciones en donde las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) y las regiones de estructura (FRs) son de origen de camélido, o las realizaciones en donde una o más de las regiones de estructura (FRs) tienen al menos una sustitución humanizante, y son de preferencia completamente humanizadas.

30 Los nanocuerpos biparatópicos particularmente preferidos de acuerdo con la invención son aquéllos designados en la presente como 163D2/127D1, 163E3/127D1, 163E3/54B12, 163D2/54B12, 2B2/163E3, 2B2/163D2, 97A9/2B2 y 97A9/54B12, los cuales tienen además la extensión C-terminal que comprende al menos un residuo de aminoácido adicional, cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la Tabla 13, y en particular, las variantes de los mismos en donde las regiones de estructura (FRs) incluyen sustituciones de aminoácidos optimizadoras de la secuencia, como se definen en la presente, y tales como se muestran para los nanocuerpos componentes de la Tabla 32.

35 Los nanocuerpos biparatópicos particularmente preferidos adicionales de acuerdo con la invención son aquéllos mostrados en la Tabla 33, los cuales tienen además una extensión C-terminal que comprende al menos un residuo de aminoácido adicional.

40 Los polipéptidos preferidos de la invención se enlanzan a un epítopo que comprende los aminoácidos F11, F14 y W15 de la SEQ ID NO: 1 (CXCR2). En los polipéptidos biparatópicos preferidos de la invención, tales como los nanocuerpos biparatópicos, el segundo dominio de enlace al antígeno se enlaza a un epítopo dentro de los ciclos externos del CXCR2 humano (residuos de aminoácidos 106-120, 184-208 y 274-294 de la SEQ ID NO: 1). En una realización de la invención, este epítopo es conformacional. En una realización de la invención, este epítopo comprende los residuos de aminoácidos W112, G115, I282 y T285 de la SEQ ID NO: 1.

45 La invención también abarca las moléculas de ácidos nucleicos que codifican cualquier polipéptido de acuerdo con la invención, así como los ácidos nucleicos que codifican los fragmentos de los mismos, tales como los ácidos nucleicos que codifican los nanocuerpos individuales que están comprendidos dentro de los nanocuerpos biparatópicos. Los vectores que comprenden los ácidos nucleicos de la invención, y las células huésped que comprenden estos vectores y que son capaces de expresar un polipéptido de acuerdo con la invención, también 50 están abarcados dentro de la invención.

55 En otro aspecto, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de acuerdo con la invención, en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Debido a que los polipéptidos de la invención son capaces de bloquear, inhibir o reducir la actividad del CXCR2, son útiles para el tratamiento de las enfermedades en donde tenga una función la transducción de señales aberrante a partir del CXCR2. Estas enfermedades pueden incluir ateroesclerosis, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria del intestino (de Crohn), angiogénesis, esclerosis múltiple, soriasis, piodesmia gangrenosa, enfermedad degenerativa macular relacionada con la edad, enfermedad ocular de Behcet, uveítis, carcinoma no microcelular, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer esofágico, melanoma, carcinoma hepatocelular, o isquemia/lesión por perfusión. Estas

enfermedades también pueden incluir condiciones del tracto respiratorio, tales como fibrosis quística, asma, asma severo, exacerbación de asma, asma alérgico, asma neutrofílico, lesión pulmonar aguda, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, fibrosis pulmonar idiopática, remodelación de las vías respiratorias, síndrome de bronquiolitis obliterante, o displasia broncopulmonar.

- 5 En una realización, los polipéptidos de la invención son para utilizarse en el tratamiento de asma, en particular de asma severo y de las exacerbaciones de asma.

En una realización particularmente preferida, los polipéptidos de la invención son para utilizarse en el tratamiento del trastorno pulmonar obstructivo crónico (COPD) o de las exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), la cual se caracteriza por migración de los leucocitos, en particular de los neutrófilos, hasta el parénquima pulmonar y la subsiguiente destrucción del mismo, cuya migración es mediada a través de la señalización del CXCR2. La capacidad de los polipéptidos de la invención para bloquear, inhibir o reducir la actividad del CXCR2 los hace excelentes candidatos para utilizarse en la prevención o el tratamiento de esta enfermedad.

10 Para el tratamiento de los seres humanos, es preferible que el polipéptido de la invención se dirija contra, o se enlace específicamente a, el CXCR2 humano. Se prefiere, sin embargo, que este polipéptido pueda reaccionar cruzadamente con el CXCR2 de primate, en particular con el CXCR2 de mono cinomolgo, con el objeto de que se pueda llevar a cabo una prueba de toxicidad apropiada en estos monos. Los polipéptidos de la invención se pueden dirigir contra, o se pueden enlazar específicamente a, los CXCR2 homólogos a partir de otras especies si se contempla el uso veterinario.

15 Otros aspectos de la invención llegarán a ser evidentes a partir de la discusión adicional en la presente.

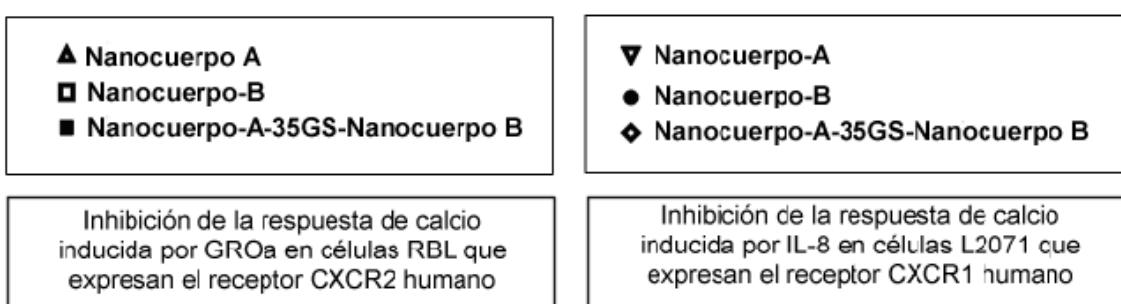
20 Descripción de las figuras

Las Figuras 1a, 1b y 1c muestran las curvas de respuesta obtenidas cuando se mide la capacidad de dos nanocuerpos y un nanocuerpo biparatópico de la invención para bloquear la liberación de [³⁵S]GTPyS a partir de las membranas de CHO-CXCR2 estimuladas con el agonista Gro- α , en concentraciones crecientes del nanocuerpo.

25 La Figura 1a muestra el resultado para el nanocuerpo 54B12 (SEQ ID NO: 90 en la Tabla 9), la Figura 1b muestra el resultado para el nanocuerpo 163E3 (SEQ ID NO: 42 en la Tabla 9), y la Figura 1c muestra el resultado para el nanocuerpo biparatópico 54B12/ 163E3 (SEQ ID NO: 68 en la Tabla 13).

30 La Figura 2 muestra la potencia y eficacia de dos nanocuerpos representativos 127D1 (Figura 2a), 163E3 (Figura 2b), y el 163E-35GS-127D1 biparatópico (Figura 2c), mediante la inhibición de GRO- α - como el porcentaje de inhibición contra la concentración del nanocuerpo en diferentes concentraciones de GRO- α . Se ve que el 127D1 es potente, pero no eficaz, mientras que el 163E3 tiene una potencia más baja, pero es más eficaz que el 127D1. Cuando se combinan las dos moléculas de enlace, se muestra que la molécula de enlace biparatópico resultante es tanto potente como eficaz.

La Figura 3 muestra el resultado de probar un polipéptido representativo de la invención, para determinar su especificidad para el CXCR2 sobre el CXCR1 como se ilustra en los siguientes paneles.



35 Los nanocuerpos anti-CXCR2 (A o B) o biparatópicos monovalentes purificados probados mostraron su potencia en nM para el hCSCR2 en respuesta a GRO α , mientras que sobre el receptor hCXCR1 estuvieron activos en concentraciones en μ M en respuesta a la liberación de calcio intracelular inducida por IL-8.

40 La Figura 4 muestra que el nanocuerpo biparatópico con una vida media prolongada con una extensión AA C-terminal de 79-76-Alb8-AA redujo significativamente la reactividad de la IgG anti-Nb desde el 50 % hasta el 20 % en los machos y desde el 61 % hasta el 16 % en las hembras. En adición, las variantes ala-Ala C-terminales de 79-76-Alb8-AA y 79-86-Alb8-AA no alteraron la actividad funcional cuando se compararon con los nanocuerpos sin las extensiones C-terminales de 79-76-Alb8 y 79-86-Alb8.

La Figura 5 muestra el efecto del nanocuerpo anti-CXCR2, 79-76-Alb8-AA, sobre la quimiotaxis de los neutrófilos humanos primarios para rhGRO- α . Los neutrófilos humanos primarios aislados, marcados con calceína-AM, se incubaron previamente con concentraciones variables del nanocuerpo anti-CXCR2, 79-76-Alb8-AA (●), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células entonces se agregaron a un inserto de múltiples pozos de 3 micras, y se permitió que se presentara la quimiotaxis para rhGRO- α 2 nM en la placa receptora durante 90 minutos a 37°C. La fluorescencia a partir de las células que habían migrado hacia dentro de los pozos de la placa receptora se midió entonces en el lector de placas BioTek Synergy a 485 nanómetros de excitación y 520 nanómetros de emisión. El 79-76-Alb8-AA inhibió la quimiotaxis estimulada por rhGRO- α con un valor de IC₅₀ de 0.256 + 0.02 nM (promedio + SEM a partir de n = 4 donadores).

10 Definiciones

En la presente descripción, ejemplos y reivindicaciones:

a) A menos que se indiquen o se definan de otra manera, todos los términos utilizados tienen su significado usual en la técnica, lo cual estará claro para la persona experta. Por ejemplo, se hace referencia a los libros de texto convencionales mencionados a continuación como sigue. Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"

15 (2a. Edición), Volúmenes. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel et al., Editores, "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., (1985); Old et al., "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", Segunda Edición, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt et al., "Immunology" (6a. Edición), Mosby/Elsevier, Edimburgo (2001); Roitt et al., Roitt's Essential Immunology, 10a. Edición, Blackwell Publishing, UK (2001); y Janeway et al., "Immunobiology" (6a. Edición), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York (2005).

b) A menos que se indique de otra manera, el término "inmunoglobulina" o "secuencia de inmunoglobulina" - ya sea que se utilice en la presente para referirse a un anticuerpo de cadena pesada o a un anticuerpo de 4 cadenas convencional - se utiliza como un término general para incluir tanto el anticuerpo de tamaño completo, las cadenas individuales del mismo, así como todas las partes, dominios o fragmentos de los mismos (incluyendo, pero no limitándose a, dominios de enlace al antígeno o fragmentos, tales como los dominios V_{HH} o los dominios V_H/V_L, respectivamente). En adición, el término "secuencia", como se utiliza en la presente (por ejemplo en términos como "secuencia de inmunoglobulina", "secuencia de anticuerpo", "secuencia de dominio variable", "secuencia V_{HH}" o "secuencia de proteína"), se debe entender en términos generales para incluir tanto a la secuencia de aminoácidos relevantes así como a las secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos que codifican los mismos, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada.

c) A menos que se indique de otra manera, el término "dominio variable único de inmunoglobulina" se utiliza como un término general para incluir, pero no limitarse a, los dominios de enlace al antígeno o fragmentos, tales como los dominios V_{HH} o los dominios V_H o V_L, respectivamente. Los términos moléculas de enlace al antígeno o proteínas de enlace al antígeno se utilizan indistintamente e incluyen también el término nanocuerpos. Los únicos dominios variables de inmunoglobulina son además secuencias de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo, una secuencia V_L), o secuencias de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia V_H); de una manera más específica, pueden ser secuencias de dominio variable de cadena pesada que se derivan a partir de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional, o secuencias de dominio variable de cadena pesada que se derivan a

40 partir de un anticuerpo de cadena pesada. De conformidad con lo anterior, los únicos dominios variables de inmunoglobulina pueden ser anticuerpos de dominio, o secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para utilizarse como anticuerpos de dominio, anticuerpos de un solo dominio, o secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para utilizarse como los anticuerpos de un solo dominio, "dAbs", o secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para utilizarse como dAbs, o nanocuerpos, incluyendo, pero no limitándose a, secuencias V_{HH}. La invención incluye secuencias de inmunoglobulina de diferente origen, las cuales comprenden secuencias de inmunoglobulina de ratón, rata, conejo, burro, humano, y de camélido. El dominio variable único de inmunoglobulina incluye secuencias de inmunoglobulina completamente humanas, humanizadas, optimizadas en la secuencia de otra manera, o químicas. Se puede considerar que el dominio variable único de inmunoglobulina y la estructura de un único dominio variable de inmunoglobulina – sin embargo, sin limitarse a lo mismo – está comprendido de cuatro

45 regiones de estructura o "FRs", las cuales son referidas en la técnica y en la presente como "Región de estructura 1" o "FR1"; como "Región de estructura 2" o "FR2"; como "Región de estructura 3" o "FR3"; y como Región de estructura 4" o "FR4", respectivamente; cuyas regiones de estructura están interrumpidas por tres regiones determinantes de complementariedad o "CDRs", las cuales son referidas en la técnica como "Región determinante de complementariedad 1" o "CDR1"; como "Región determinante de complementariedad 2" o "CDR2"; y como "Región determinante de complementariedad 3" o "CDR3", respectivamente.

d) A menos que se indique de otra manera, todos los métodos, pasos, técnicas y manipulaciones que no se describan específicamente con detalle, se pueden llevar a cabo y se han llevado a cabo de una manera conocida por sí misma, como quedará claro para la persona experta. Nuevamente se hace referencia, por ejemplo, a los libros de texto convencionales y a la técnica antecedente general mencionada en la presente, y a las referencias adicionales citadas en los mismos; así como, por ejemplo, a las siguientes reseñas: Presta, Adv. Drug Deliv. Rev. 2006, 58 (5-6): 640-56; Levin y 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 Suplemento A, S106-12, Gonzales et al., Tumour Biol., 2005, 26(1), 31-43, los cuales describen técnicas para el diseño de proteínas, tales como maduración de afinidad y otras técnicas para mejorar la especificidad y otras propiedades deseadas de las proteínas, tales como las inmunoglobulinas.

- 5 e) Los residuos de aminoácidos se indicarán de acuerdo con el código de aminoácidos convencional de tres letras o de una letra.
- f) Para los propósitos de comparar dos o más secuencias de nucleótidos, el porcentaje de "identidad de secuencias" entre una primera secuencia de nucleótidos y una segunda secuencia de nucleótidos se puede calcular o determinar dividiendo [el número de nucleótidos de la primera secuencia de nucleótidos que sean idénticos a los nucleótidos en las posiciones correspondientes de la segunda secuencia de nucleótidos] entre [el número total de nucleótidos de la primera secuencia de nucleótidos] y multiplicando por [100 %], en donde cada supresión, inserción, sustitución o adición de un nucleótido de la segunda secuencia de nucleótidos - comparándose con la primera secuencia de nucleótidos - se considera como una diferencia en un solo nucleótido (posición); o utilizando un algoritmo o una técnica de computación adecuada. El grado de identidad de secuencias entre dos o más secuencias de nucleótidos se puede calcular utilizando un algoritmo de computación conocido para la alineación de secuencias, tal como NCBI Blast v2.0, utilizando los ajustes convencionales. Algunas otras técnicas, algoritmos de computación y ajustes para determinar el grado de identidad de secuencias se describen, por ejemplo, en la Publicación Internacional Número WO 04/037999, en las Patentes Europeas Números EP 0 967 284, EP 1 085 089, en las Publicaciones Internacionales Números WO 00/55318, WO 00/78972, y WO 98/49185, y en la Patente Británica Número GB 2 357 768-A. Usualmente, para el propósito de determinar el porcentaje de "identidad de secuencias" entre dos secuencias de nucleótidos de acuerdo con el método de cálculo ilustrado anteriormente en la presente, la secuencia de nucleótidos con el mayor número de nucleótidos se tomará como la "primera" secuencia de nucleótidos, y la otra secuencia de nucleótidos se tomará como la "segunda" secuencia de nucleótidos.
- 10 g) Para los propósitos de comparar dos o más secuencias de aminoácidos, el porcentaje de "identidad de secuencias" entre una primera secuencia de aminoácidos y una segunda secuencia de aminoácidos (también referida en la presente como "identidad de aminoácidos") se puede calcular o determinar dividiendo [el número de los residuos de aminoácidos de la primera secuencia de aminoácidos que sean idénticos a los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes de la segunda secuencia de aminoácidos] entre [el número total de residuos de aminoácidos de la primera secuencia de aminoácidos] y multiplicando por [100 %], en donde cada supresión, inserción, sustitución o adición de un residuo de aminoácido en la segunda secuencia de aminoácidos - comparándose con la primera secuencia de aminoácidos - se considera como una diferencia en un solo residuo de aminoácido (posición), es decir, como una "diferencia de aminoácido" como se define en la presente; o utilizando un algoritmo o una técnica de computación adecuada. Para el propósito de determinar el porcentaje de "identidad de secuencias" entre dos secuencias de aminoácidos de acuerdo con el método de cálculo ilustrado anteriormente en la presente, la secuencia de aminoácidos con el mayor número de residuos de aminoácidos se tomará como la "primera" secuencia de aminoácidos, y la otra secuencia de aminoácidos se tomará como la "segunda" secuencia de aminoácidos.
- 15 h) Cuando se comparan dos secuencias de aminoácidos, el término "diferencia de aminoácido" se refiere a una inserción, supresión o sustitución de un solo residuo de aminoácido en una posición de la primera secuencia, comparándose con la segunda secuencia; entendiéndose que dos secuencias de aminoácidos pueden contener una, dos o más de estas diferencias de aminoácidos.
- 20 i) Cuando se dice que una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos "comprende" otra secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, o "consiste esencialmente en otra secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, esto puede significar que esta última secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos se ha incorporado en la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos primeramente mencionada, respectivamente, pero más usualmente esto significa, en términos generales, que la secuencia de

25 También, en la determinación del grado de identidad de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos, la persona experta puede tomar en cuenta las denominadas como sustituciones de aminoácidos "conservadoras", como se dan a conocer en v) más adelante.

30 Cualesquiera sustituciones de aminoácidos aplicadas a los polipéptidos descritos en la presente también se pueden basar en el análisis de las frecuencias de las variaciones de aminoácidos entre las proteínas homólogas de diferentes especies desarrolladas por Schulz et al., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1978, en los análisis de los potenciales formadores de estructuras desarrollados por Chou y Fasman, Biochemistry 13: 211, 1974 y Adv. Enzymol., 47: 45-149, 1978, y en el análisis de los patrones de hidrofobicidad en las proteínas desarrolladas por Eisenberg et al., Proc. Nad. Acad. Sci. EUA 81: 140-144, 1984; Kyte y Doolittle; J Molec. Biol. 157: 105-132, 198 1, y Goldman et al., Ann. Rev. Biophys. Chem. 15: 321-353, 1986, todos incorporados a la presente en su totalidad como referencia. Con respecto a la estructura primaria y secundaria de los nanocuerpos, la estructura del cristal de un dominio V_{HH} de una llama es dada, por ejemplo, por Desmyter et al., Nature Structural Biology, Volumen 3, 9, 803 (1996); Spinelli et al., Natural Structural Biology (1996); 3, 752-757; y Decanniere et al., Structure, Volumen 7, 4, 361 (1999).

35 h) Cuando se comparan dos secuencias de aminoácidos, el término "diferencia de aminoácido" se refiere a una inserción, supresión o sustitución de un solo residuo de aminoácido en una posición de la primera secuencia, comparándose con la segunda secuencia; entendiéndose que dos secuencias de aminoácidos pueden contener una, dos o más de estas diferencias de aminoácidos.

40 i) Cuando se dice que una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos "comprende" otra secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, o "consiste esencialmente en otra secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, esto puede significar que esta última secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos se ha incorporado en la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos primeramente mencionada, respectivamente, pero más usualmente esto significa, en términos generales, que la secuencia de

nucleótidos o la secuencia de aminoácidos primeramente mencionada comprende, dentro de su secuencia, un estiramiento de nucleótidos o de residuos de aminoácidos, respectivamente, que tiene la misma secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, que la última secuencia, sin importar la manera en que la secuencia primeramente mencionada se haya generado u obtenido realmente (lo cual puede ser, por ejemplo, mediante cualquier método adecuado descrito en la presente). Por medio de un ejemplo no limitante, cuando se dice que un único dominio variable de inmunoglobulina biparatópico, por ejemplo, un nanocuerpo, comprende una secuencia de una región determinante de complementariedad (CDR), esto puede significar que esta secuencia de una región determinante de complementariedad (CDR) se ha incorporado en el nanocuerpo biparatópico de la invención, pero más usualmente esto significa, en términos generales, que el nanocuerpo biparatópico de la invención contiene, dentro de su secuencia, un estiramiento de residuos de aminoácidos con la misma secuencia de aminoácidos como la secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR), sin importar la manera en que se haya generado u obtenido el nanocuerpo biparatópico. También se debe observar que, cuando esta última secuencia de aminoácidos tiene una función biológica o estructural específica, de preferencia tiene esencialmente la misma o una función biológica o estructural similar o equivalente en la secuencia de aminoácidos primeramente mencionada (en otras palabras, la secuencia de aminoácidos primeramente mencionada es de preferencia tal que esta última secuencia es capaz de llevar a cabo esencialmente la misma o una función biológica o estructural similar o equivalente). Por ejemplo, cuando se dice que un nanocuerpo biparatópico de la invención comprende una secuencia de una región determinante de complementariedad (CDR) o una secuencia de estructura, respectivamente, la secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR) y la estructura son de preferencia capaces, en el nanocuerpo biparatópico, de funcionar como una secuencia de una región determinante de complementariedad (CDR) o como una secuencia de estructura, respectivamente. También, cuando se dice que una secuencia de nucleótidos comprende otra secuencia de nucleótidos, la secuencia de nucleótidos primeramente mencionada es de preferencia tal que, cuando se expresa en un producto de expresión (por ejemplo, un polipéptido), la secuencia de aminoácidos codificada por esta última secuencia de nucleótidos forma parte de este producto de expresión (en otras palabras, que esta última secuencia de nucleótidos está en el mismo marco de lectura que la secuencia de nucleótidos más grande primeramente mencionada).

j) Una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos se considera como "(en una forma) esencialmente aislada" - por ejemplo, comparándose con su fuente biológica nativa y/o el medio de reacción o el medio de cultivo a partir del cual se ha obtenido - cuando se ha separado a partir de al menos otro componente con el que está usualmente asociado en esa fuente o en ese medio, tal como otro ácido nucleico, otra proteína/polipéptido, otro componente biológico o macromolécula, o al menos un contaminante, impureza o componente menor. En particular, una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos se considera "esencialmente aislada" cuando se ha purificado al menos 2 veces, en particular al menos 10 veces, más particularmente, al menos 100 veces, y hasta 1,000 veces o más. Una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos que está "en una forma esencialmente aislada" es de preferencia esencialmente homogénea, como se determina utilizando una técnica adecuada, tal como una técnica cromatográfica adecuada, tal como electroforesis en gel de poliacrilamida;

k) El término "dominio de enlace al antígeno", como se utiliza en la presente, se refiere a una secuencia de aminoácidos en una inmunoglobulina que comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) y que es de una conformación para reconocer un determinante antigénico objetivo o epítopo.

l) Los términos "determinante antigénico" y "epítopo", que también se pueden utilizar de una manera intercambiable en la presente, se refieren a una secuencia de aminoácidos dentro del CXCR2 objetivo, la cual es reconocida por los dominios de enlace al antígeno, ya sea en una conformación lineal o no lineal.

m) Se dice que un polipéptido de la invención, tal como, por ejemplo, un nanocuerpo biparatópico como se describe en la presente, o un fragmento del mismo que se puede enlazar (de una manera específica) a, que tiene afinidad por, y/o que tiene especificidad para, un determinante antigénico, epítopo, antígeno o proteína específicos (o para al menos una parte, fragmento o epítopo de los mismos), está "contra" o "dirigido contra" ese determinante antigénico, epítopo, antígeno o proteína.

n) El término "especificidad" se refiere al número de diferentes tipos de antígenos o determinantes antigenicos con los que se puede enlazar un dominio de enlace al antígeno particular de un polipéptido de la invención. La especificidad de una proteína de enlace al antígeno para cualquier antígeno/epítopo particular se puede determinar basándose en la afinidad y/o avidez, como se describe en las páginas 53-56 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079, que también describe algunas técnicas preferidas para medir el enlace entre un polipéptido y el antígeno o epítopo pertinente. Típicamente, en cada proteína de enlace al antígeno (tal como los polipéptidos de la invención), cada dominio de enlace al antígeno puede enlazarse independientemente con su antígeno/epítopo con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y de preferencia de 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos, y de una manera muy preferible de 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro (es decir, con una constante de asociación (K_A) de 10^5 a 10^{12} litros/mol o más, y de preferencia de 10^7 a 10^{12} litros/mol o más, y de una manera muy preferible de 10^8 a 10^{12} litros/mol). Cualquier valor K_D mayor de 10^4 moles/litro (o cualquier valor K_A menor de $10^4 M^{-1}$) litros/mol, se considera en general que indica el enlace no específico. De preferencia, el polipéptido biparatópico de la invención se enlazará al antígeno deseado con una afinidad menor de 500 nM, de preferencia menor de 200 nM, más preferiblemente menor de 10 nM, tal como menor de 500 pM. El enlace específico del polipéptido de la invención al

CXCR2 se puede determinar de cualquier manera adecuada conocida por sí misma, incluyendo, por ejemplo, el análisis de Scatchard y/o los ensayos de enlace competitivo, tales como los radio-inmunoensayos (RIA), los inmunoensayos enzimáticos (EIA), y los ensayos de competición de emparedado, y las diferentes variantes de los mismos conocidas por sí mismas en este campo; así como las otras técnicas mencionadas en la presente. Como quedará claro para la persona experta, y como se describe en las páginas 53-56 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079, la constante de disociación puede ser la constante de disociación real o aparente. Los métodos para determinar la constante de disociación quedarán claros para la persona experta y, por ejemplo, incluyen las técnicas mencionadas en las páginas 53-56 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079.

o) La vida media de un polipéptido de la invención, en particular de un nanocuerpo biparatópico de acuerdo con la invención, se puede definir en términos generales como el tiempo que se necesita para que la concentración en suero del polipéptido de la invención se reduzca por el 50 %, *in vivo*, por ejemplo, debido a la degradación del polipéptido y/o a la eliminación o el secuestro del polipéptido mediante los mecanismos naturales. La vida media *in vivo* de un polipéptido de la invención se puede determinar de cualquier manera conocida por sí misma, tal como mediante un análisis farmacocinético. Las técnicas adecuadas quedarán claras para la persona experta en este

campo y, por ejemplo, en términos generales, pueden ser como se describen en el párrafo o) de la página 57 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079. Como también se menciona en la misma, en la página 57 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079, la vida media se puede expresar utilizando los parámetros tales como el t_{1/2}-alfa, t_{1/2}-beta, y el área debajo de la curva (AUC). Se hace referencia, por ejemplo, a la parte experimental que se encuentra más adelante, así como a los libros de texto convencionales, tales como Kenneth, A et al.: *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists*, y Peters et al., *Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach* (1996). También se hace referencia a "Pharmacokinetics", M Gibaldi y D Perron, publicado por Marcel Dekker, 2a. Edición Revisada (1982). Los términos "aumento en la vida media" o "vida media aumentada" se refieren a un aumento en el t_{1/2}-beta, ya sea con o sin un aumento en el t_{1/2}-alfa y/o en el área debajo de la curva (AUC), o en ambos.

p) En el contexto de la presente invención, "bloquear, reducir o inhibir" la actividad del CXCR2 como se mide utilizando un ensayo *in vitro*, celular o *in vivo* adecuado, puede significar ya sea bloquear, reducir o inhibir la actividad de una actividad biológica relevante o pretendida del CXCR2, por al menos el 1 %, de preferencia por al menos el 5 %, tal como por al menos el 10 %, o por al menos el 25 %, por ejemplo, por al menos el 50 %, por al menos el 60 %, por al menos el 70 %, por al menos el 80 % o el 90 % o más, comparándose con la actividad del CXCR2 en el mismo ensayo bajo las mismas condiciones pero sin la presencia del polipéptido de la invención.

Como quedará claro para la persona experta, la inhibición también puede involucrar efectuar una disminución en la afinidad, avidez, especificidad y/o selectividad del CXCR2 para uno o más de sus ligandos o componentes de enlace, y/o efectuar una disminución en la sensibilidad del CXCR2 a una o más condiciones en el medio o en los alrededores en donde esté presente el CXCR2 (tal como pH, concentración iónica, la presencia de co-factores, etc.),

comparándose con las mismas condiciones pero sin la presencia del polipéptido de la invención. Como quedará claro para la persona experta, esto se puede determinar nuevamente de cualquier manera adecuada y/o utilizando cualquier ensayo adecuado conocido por sí mismo, dependiendo del objetivo o antígeno involucrado.

q) Como se utiliza en la presente, "modulación" puede significar la modulación aloestérica del CXCR2; y/o reducir o inhibir el enlace del CXCR2 a uno de sus ligandos, y/o competir con un ligando natural por el enlace al CXCR2. La modulación, por ejemplo, también puede involucrar efectuar un cambio con respecto al pliegue o a la conformación del CXCR2, o con respecto a su capacidad para cambiar su conformación (por ejemplo, después de enlazarse al ligando), asociarse con otras (sub)unidades, o disociarse. La modulación, por ejemplo, también puede involucrar efectuar un cambio en la capacidad del CXCR2 para transportar otros compuestos o para servir como un canal para otros compuestos (tales como iones).

r) La modulación, en particular la inhibición o la reducción de la actividad del CXCR2 mediante los polipéptidos de la invención, en particular mediante los nanocuerpos biparatópicos de la invención, puede ser reversible o irreversible, pero, para los propósitos farmacéuticos y farmacológicos, usualmente es de una manera reversible.

s) Se dice que un polipéptido de la invención es "específico para" CXCR2 comparándose con un segundo objetivo o antígeno, cuando se enlaza al CXCR2 con una afinidad (como se describe anteriormente, y como se expresa de una manera adecuada como un valor K_D, un valor K_A, un índice K_{desactivada} y/o un índice K_{activada}) que es al menos 10 veces, tal como al menos 100 veces, y de preferencia al menos 1,000 veces, y hasta 10,000 veces o más de la afinidad con que se enlaza a un segundo objetivo o polipéptido. Por ejemplo, el polipéptido de la invención se puede enlazar al CXCR2 en un valor K_D que es al menos 10 veces menor, tal como al menos 100 veces menor, y de preferencia al menos 1,000 veces menor, tal como 10,000 veces menor, o incluso todavía menor que eso, que la K_D con que se enlaza a otro objetivo o polipéptido o epítopo del mismo.

t) Los términos "bloqueo cruzado", "bloqueado cruzadamente" y "bloquear cruzadamente" se utilizan indistintamente en la presente para significar la capacidad de un único dominio variable de inmunoglobulina o polipéptido para interferir con el enlace de otros únicos dominios variables de inmunoglobulina o polipéptidos de la invención a un objetivo dado. El grado hasta el cual un único dominio variable de inmunoglobulina o polipéptido de la invención es capaz de interferir con el enlace de otro objetivo, y por consiguiente, se puede decir que lo bloquea

cruzadamente de acuerdo con la invención, se puede determinar utilizando ensayos de enlace de competición. Un ensayo de bloqueo cruzado cuantitativo particularmente adecuado utiliza un planteamiento basado en FACS o en ELISA para medir la competición entre el dominio variable único de inmunoglobulina o polipéptido marcado (por ejemplo, marcado con His, radiactivamente o fluorescentemente marcado) de acuerdo con la invención, y el otro agente de enlace en términos de su enlace al objetivo. La parte experimental en términos generales describe un ensayo adecuado basado en el desplazamiento de FACS y ELISA para determinar si una molécula de enlace bloquea cruzadamente, o es capaz de bloquear cruzadamente, un único dominio variable de inmunoglobulina o polipéptido de acuerdo con la invención. Se apreciará que el ensayo se puede utilizar con cualquiera de los únicos dominios variables de inmunoglobulina u otros agentes de enlace descritos en la presente. Por consiguiente, en general, una secuencia de aminoácidos de bloqueo cruzado u otro agente de enlace de acuerdo con la invención, es una que se enlazará al objetivo en el ensayo de bloqueo cruzado anterior, de tal manera que, durante el ensayo y en la presencia de una segunda secuencia de aminoácidos u otro agente de enlace de la invención, el desplazamiento registrado del único dominio variable de inmunoglobulina o polipéptido de acuerdo con la invención, es de entre el 50 % y el 100 % del máximo desplazamiento teórico por el agente que es potencialmente de bloqueo cruzado que se va a probar (por ejemplo, otro fragmento de anticuerpo, V_H, dAb o una variante V_H/V_L similar).

t) Se dice que un polipéptido de acuerdo con la invención es "de reacción cruzada" para dos diferentes antígenos o determinantes antigenéticos (tales como albúmina de suero o CXCR2 a partir de dos diferentes especies de mamífero, tales como humano y mono cinomolgo) si es específico para (como se definen en la presente) ambos de estos diferentes antígenos o determinantes antigenéticos.

u) Como se definen en la presente, "cambios de aminoácidos conservadores" se refiere a las sustituciones de aminoácidos en donde un residuo de aminoácido es reemplazado con otro residuo de aminoácido de una estructura química similar, y el cual tiene poca o esencialmente ninguna influencia sobre la función, actividad u otras propiedades biológicas del polipéptido. Estas sustituciones de aminoácidos conservadoras son bien conocidas en la materia, por ejemplo a partir de la Publicación Internacional Número WO 04/037999, de la Patente Británica Número GB-A-3 357 768, de las Publicaciones Internacionales Números WO 98/49185, WO 00/46383 y WO 01/09300; y se pueden seleccionar (preferido) tipos y/o combinaciones de estas sustituciones con base en las enseñanzas pertinentes de la Publicación Internacional Número WO 04/037999 así como de la Publicación Internacional Número WO 98/49185, y de las referencias adicionales citadas en las mismas.

Las sustituciones conservadoras de preferencia son sustituciones en donde un aminoácido dentro de los siguientes grupos (a) - (e) está sustituido por otro residuo de aminoácido dentro del mismo grupo: (a) residuos pequeños alifáticos, no polares, o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro y Gly; (b) residuos polares negativamente cargados y sus amidas (no cargadas): Asp, Asn, Glu y Gln; (c) residuos polares positivamente cargados: His, Arg y Lys; (d) residuos grandes alifáticos no polares: Met, Leu, Ile, Val y Cys; y (e) residuos aromáticos: Phe, Tyr y Trp.

Las sustituciones conservadoras particularmente preferidas son como siguen: Ala en Gly o en Ser; Arg en Lys; Asn en Gln o en His; Asp en Glu; Cys en Ser; Gln en Asn; Glu en Asp; Gly en Ala o en Pro; His en Asn o en Gln; Ile en Leu o en Val;

Leu en Ile o en Val; Lys en Arg, en Gln o en Glu; Met en Leu, en Tyr o en Ile; Phe en Met, en Leu o en Tyr; Ser en Thr; Thr en Ser; Trp en Tyr; Tyr en Trp; y/o Phe en Val, en Ile o en Leu.

v) Como se utiliza en la presente, una región determinante de complementariedad (CDR) es una región determinante de complementariedad de los polipéptidos de la invención. Una región determinante de complementariedad (CDR) es un estiramiento de aminoácidos que solo o en combinación con una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs) diferentes establece la complementariedad con los antígenos o epítopos que reconoce el polipéptido de la invención. Las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) se identifican en las secuencias de aminoácidos mediante ciertas convenciones de numeración. Con respecto a las reivindicaciones y la descripción específica en la presente, se utiliza la numeración de Kabat.

w) Como se utiliza en la presente FR es una región de estructura (algunas veces denominada como una FW). Las regiones de estructura son estiramientos de aminoácidos que flanquean la una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs) y las soportan en la conformación tridimensional correcta para el reconocimiento del antígeno o del epítopo. Las regiones de estructura (FRs) no son específicas para el antígeno o epítopo objetivo pero son específicas para el origen de la especie o el tipo de moléculas de inmunoglobulina en donde estén presentes. Como se discute con detalle en la presente, en los polipéptidos de la invención hay alcance para que se diseñen las secuencias de aminoácidos de la región de estructura para ser diferentes de la secuencia de estructura aplicada por la fuente de la inmunoglobulina, por ejemplo, de camélido.

x) Como se utiliza en la presente, CXCR2 se refiere a un receptor de quimiocina presente al menos sobre la superficie de los leucocitos y para el cual el ligando que se presenta naturalmente puede ser Gro- α , β , γ , IL-8, ENA-78 o GCP-2. CXCR2 en general se refiere en la presente a cualquier proteína que exhiba función de CXCR2 independientemente de la especie de origen. Sin embargo, como se utiliza en la presente, el CXCR2 humano se refiere a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en la SEQ ID NO: 1, o a cualquier variante alelica u ortólogo de la misma, y CXCR2 de cinomolgo se refiere a una proteína que comprende la

secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 3, o a cualquier variante alélica u ortólogo de la misma.

y) Como se utiliza en la presente, "optimización de la secuencia" se refiere a facilitar las sustituciones, inserciones o supresiones en una secuencia de aminoácidos para los propósitos de asegurar las propiedades o características estructurales particulares que puedan no estar presentes en la secuencia nativa. Estas sustituciones, inserciones o supresiones se pueden llevar a cabo, por ejemplo, para el propósito de la estabilización química, para mejoras en la capacidad para elaborarse, para evitar la formación de piroglutamato o la oxidación o isomerización. Los métodos para lograr la optimización en las propiedades que se pueden emplear para los polipéptidos biparatópicos, en particular los nanocuerpos biparatópicos de la invención, se describen en la Publicación Internacional Número WO 2009/095235, la cual se incorpora a la presente como referencia. Las técnicas de optimización de secuencia se

5 pueden llevar a cabo también para el propósito de humanizar un polipéptido biparatópico de la invención de una manera como se describe en la presente. Por consiguiente, siempre que se utilice optimización de secuencia, optimizar la secuencia, o secuencia optimizada en la presente, esto abarca la referencia específica a sustituciones o inserciones humanizantes y a polipéptidos biparatópicos parcial o completamente humanizados, de preferencia los nanocuerpos biparatópicos.

10

15 z) Como se utiliza en la presente, una "extensión C-terminal" se refiere a los residuos de aminoácidos que se han agregado al término C de la cadena del polipéptido. Esta extensión es de al menos uno, de preferencia de al menos dos residuos de aminoácidos de longitud, y funciona para enmascarar un epítopo que de otra manera podría ser capaz de interactuar con las moléculas de IgG encontradas en el suero de algunos individuos.

Descripción detallada de la invención

20 En un primer aspecto, la invención proporciona un polipéptido que comprende dos dominios de enlace al antígeno de inmuno-globulina, cuyo polipéptido se dirige contra, o se enlaza a, el receptor de quimiocina CXCR2, en donde el primer dominio de enlace al antígeno está comprendido dentro de un primer dominio V_{HH} o fragmento del mismo a partir de una sola cadena pesada de un anticuerpo de cadena pesada derivado a partir de un camélido, o es una variante de secuencia optimizada, incluyendo humanizada, del mismo, y el segundo dominio de enlace al antígeno

25 está comprendido dentro de un segundo dominio V_{HH} o fragmento del mismo a partir de una sola cadena pesada de un anticuerpo de cadena pesada derivado a partir de un camélido, o es una variante de secuencia optimizada, incluyendo humanizada, del mismo, y en donde el término C del polipéptido comprende una extensión de la secuencia de los dominios de enlace al antígeno de al menos un residuo de aminoácido adicional; y en donde el primer dominio de enlace al antígeno reconoce un primer epítopo sobre el CXCR2, y el segundo dominio de enlace

30 al antígeno reconoce un segundo epítopo sobre el CXCR2.

Se debe entender que todas las realizaciones que se dan a conocer en la presente comprenden una extensión C-terminal para el dominio de enlace al antígeno, como se menciona anteriormente, ya sea que esto se discuta específicamente para cualquier realización dada o no. Los polipéptidos de la invención, por consiguiente, comprenden todos dicha extensión C-terminal.

35 Un polipéptido preferido de la invención comprende un primer dominio de enlace al antígeno que es capaz de enlazarse a un péptido lineal que consiste en la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 7, y un segundo dominio de enlace al antígeno que no es capaz de enlazarse, o bien se enlaza con una afinidad más baja, al péptido lineal mencionado. La SEQ ID NO: 7 representa los primeros 19 aminoácidos N-terminales del CXCR2 humano.

40 En una realización, el primer dominio de enlace al antígeno reconoce un primer epítopo que comprende o que está dentro de los aminoácidos 1 a 19 del CXCR2 y los segundos dominios de enlace al antígeno reconocen un segundo epítopo sobre el CXCR2 fuera de los aminoácidos 1 a 19.

La región variable de una sola cadena de este anticuerpo de cadena pesada se conoce como el dominio V_{HH}, y comprende un fragmento de anticuerpo conocido como un nanocuerpo. Un nanocuerpo puede comprender el dominio V_{HH} entero o un fragmento del mismo. Para una descripción general de los anticuerpos de cadena pesada y de los dominios variables de los mismos, se hace referencia a la técnica anterior mencionada en la página 59 de la Publicación Internacional Número WO08/020079, y a la lista de referencias mencionadas en las páginas 41 a 43 de la Publicación Internacional Número WO06/040153. Los dominios V_{HH} tienen un número de características estructurales y propiedades funcionales únicas que hacen que los dominios V_{HH} aislados (así como los nanocuerpos basados en los mismos con las mismas características estructurales y funcionales que los dominios V_{HH} que se presentan naturalmente) y los polipéptidos contengan las mismas características altamente convenientes que los dominios de enlace al antígeno o polipéptidos funcionales. En particular, los dominios V_{HH} (los cuales han sido "diseñados" por la naturaleza para enlazarse funcionalmente al antígeno sin la presencia, o sin interacción alguna con, un dominio variable de cadena ligera) y los nanocuerpos pueden funcionar como una sola unidad estructural, dominio o proteína de enlace al antígeno funcional relativamente pequeña. Como se utiliza en la presente, el término Nanocuerpo abarca no solamente los dominios V_{HH} que se presentan naturalmente y los fragmentos de los mismos, sino también las variantes y los derivados de los mismos, como se discute con detalle en la presente.

En la realización más preferida de la invención, el polipéptido biparatópico de la invención es uno en donde el primer

dominio de enlace al antígeno está comprendido dentro de un primer nanocuerpo, y el segundo dominio de enlace al antígeno está comprendido dentro de un segundo nanocuerpo, y los primero y segundo nanocuerpos se unen mediante un enlazador.

La estructura del dominio V_{HH} puede ser representada como;

5 FR-CDR-FR-CDR-FR-CDR-FR

y el polipéptido biparatópico de la invención puede tener una de las siguientes estructuras:

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

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

10 • FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--ENLAZADOR--HLE--ENLAZADOR--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8-EXT

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

15 en donde, si FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 comprende el primer dominio de enlace al antígeno, entonces FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 comprende el segundo dominio de antígeno, y si FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 comprende el segundo dominio de antígeno, entonces FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 comprende el primer dominio de enlace al antígeno, y el HLE es una unidad de enlace que proporciona un aumento de la vida media *in vivo*, y EXT es una extensión C-terminal de al menos un residuo de aminoácido adicional.

20 De conformidad con lo anterior, como se utiliza en la presente, un “nanocuerpo biparatópico de acuerdo con la invención” se refiere a un polipéptido que comprende dos nanocuerpos únicos unidos por un enlazador.

Sin embargo, los nanocuerpos biparatópicos de la invención pueden incluir solamente una región determinante de complementariedad (CDR) en cada nanocuerpo. Si es así, la región determinante de complementariedad (CDR) preferida es la CDR3 y/o la CDR6. Sin embargo, los nanocuerpos biparatópicos de acuerdo con la invención pueden incluir CDR1 o CDR2 o CDR3 o CDR1 y CDR2 o CDR1 y CDR3 o CDR2 y CDR3 o CDR1 y CDR2 y CDR3 en el nanocuerpo N-terminal, y cualquiera de las siguientes combinaciones en el nanocuerpo C-terminal: CDR4 o CDR5 o CDR6 o CDR4 y CDR5 o CDR4 y CDR6 o CDR5 y CDR6 o CDR4 y CDR5 y CDR6. Como se indica anteriormente, el nanocuerpo biparatópico de la invención puede comprender todas las CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 y CDR6, estando cada CDR flanqueada por una región de estructura (FR).

25 Las regiones de estructura (FRs) pueden tener secuencias de aminoácidos consistentes con la fuente de camélido. Sin embargo, en las realizaciones preferidas, una o más de las regiones de estructura (FRs) tienen al menos una sustitución de aminoácido optimizante de la secuencia, y de preferencia una o más de, y de una manera muy preferible todas, las regiones de estructura (FRs) están parcialmente o completamente humanizadas. Las sustituciones para la optimización de secuencias se discuten con mayor detalle más adelante.

30 Se menciona en la presente también que, en las realizaciones de la invención en donde los primero y segundo dominios de enlace al antígeno están comprendidos en un primero y segundo únicos dominios variables de inmunoglobulina que no son nanocuerpos pero que están en los dominios o fragmentos de los anticuerpos convencionales, como se discute anteriormente, por ejemplo, los anticuerpos, dominios o fragmentos humanos, es posible modificar las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) en los mismos con al menos una sustitución camelizante, y opcionalmente generar regiones determinantes de complementariedad (CDRs) completamente camelizadas.

35 Como se describe adicionalmente en la presente, el número total de residuos de aminoácidos en un solo nanocuerpo puede estar en la región de 110-120, de preferencia de 112-115, y más preferiblemente de 113. Sin embargo, se debe observar que las partes, fragmentos, análogos o derivados (como se describen adicionalmente en la presente) de un nanocuerpo, no están particularmente limitados con respecto a su longitud y/o tamaño, siempre que estas partes, fragmentos, análogos o derivados cumplan con los requerimientos adicionales ilustrados en la presente, y sean también de preferencia adecuados para los propósitos descritos en la presente.

40 Como se describe adicionalmente en la presente, los residuos de aminoácidos de un nanocuerpo se numeran de acuerdo con la numeración general para los dominios V_H dada por Kabat et al. (“Sequence of proteins of immunological interest”, US Public Health Services (Servicios de Salud Pública de los Estados Unidos), NIH Bethesda, MD, Publicación No. 91), como se aplica a los dominios V_{HH} a partir de Camélidos en el artículo de Riechmann y Muyldermans, J. Immunol. Methods, 23 de Junio de 2000; 240 (1-2): 185-195 (véase, por ejemplo, la Figura 2 de esta publicación), y de conformidad con lo anterior, la FR1 de un nanocuerpo puede comprender los residuos de aminoácidos en las posiciones 1-30, la CDR1 de un nanocuerpo puede comprender los residuos de aminoácidos en las posiciones 31-35, la FR2 de un nanocuerpo puede comprender los aminoácidos en las

posiciones 36-49, la CDR2 de un nanocuerpo puede comprender los residuos de aminoácidos en las posiciones 50-65, la FR3 de un nanocuerpo puede comprender los residuos de aminoácidos en las posiciones 66-94, la CDR3 de un nanocuerpo puede comprender los residuos de aminoácidos en las posiciones 95-102, y FR4 de un nanocuerpo puede comprender los residuos de aminoácidos en las posiciones 103-113. En el nanocuerpo biparatópico preferido de la invención, el nanocuerpo N-terminal puede tener regiones de estructura (FRs) y regiones determinantes de complementariedad (CDRs) en las posiciones dadas anteriormente, y en el nanocuerpo C-terminal, la FR5 del nanocuerpo puede comprender los residuos de aminoácidos en las posiciones 1-30, la CDR4 del nanocuerpo puede comprender los residuos de aminoácidos en las posiciones 31-35, la FR6 del nanocuerpo puede comprender los aminoácidos en las posiciones 36-49, la CDR5 del nanocuerpo puede comprender los residuos de aminoácidos en las posiciones 50-65, la FR7 del nanocuerpo puede comprender los residuos de aminoácidos en las posiciones 66-94, la CDR6 del nanocuerpo puede comprender los residuos de aminoácidos en las posiciones 95-102, y la FR8 del nanocuerpo puede comprender los residuos de aminoácidos en las posiciones 103-113.

Sin embargo, se apreciará que las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) y las regiones de estructura (FRs) en un anticuerpo, y en particular, en un nanocuerpo, se pueden identificar mediante sistemas de numeración alternativos al de Kabat. Éstos incluyen los sistemas de Chotia, IMGT y AHo. La identificación de las posiciones de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) o de las regiones de estructura (FRs) de cualquiera de las secuencias de aminoácidos identificadas en las Tablas 9, 13, 19, 32, 33 y 34, de acuerdo con estos sistemas de numeración alternativos, se puede lograr mediante el análisis de las secuencias. Para este propósito, se puede hacer referencia a los siguientes sitios web: <http://www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/> (Chotia); <http://imgt.cines.fr> (IMGT), y <http://www.bio.uzh.ch/antibody/index.html> (AHo). De una manera específica, en los nanocuerpos biparatópicos preferidos de la invención descrita en la presente, las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) 1, 2, 3, 4, 5 o 6 se pueden definir mediante uno de estos sistemas de numeración alternativos al de Kabat, pero todavía estarán dentro del alcance de la invención.

Las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de Chotia para algunos nanocuerpos de acuerdo con la invención, se muestran en la Tabla 35.

Los nanocuerpos pueden ser de los denominados como "clase V_H3" (es decir, los nanocuerpos con un alto grado de homología de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana de la clase V_H3, tales como DP-47, DP-51 o DP-29), cuyos nanocuerpos se prefieren para la construcción de los nanocuerpos biparatópicos de esta invención. Sin embargo, se debe observar que cualquier tipo de nanocuerpo dirigido contra CXCR2, y, por ejemplo, los nanocuerpos pertenecientes a los denominados como "clase V_H4" (es decir, los nanocuerpos con un alto grado de homología de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana de la clase V_H4, tales como DP-78), como, por ejemplo, se describen en la Publicación Internacional Número WO 07/118670, se pueden utilizar en la construcción de los nanocuerpos biparatópicos de la invención.

La molécula enlazadora que une al uno o más péptidos o polipéptidos, los cuales comprenden los primero y segundo dominios de enlace al antígeno de acuerdo con la invención, puede ser o no de origen de inmunoglobulina. Cuando el polipéptido de la invención es un único dominio variable de inmunoglobulina biparatópico, por ejemplo, un nanocuerpo, el enlazador une el término C de un único dominio variable de inmunoglobulina que comprende un dominio de enlace al antígeno con el término N de otro único dominio variable de inmunoglobulina que comprende un dominio de enlace al antígeno.

Los espaciadores o enlazadores adecuados para utilizarse en los polipéptidos biparatópicos de la invención para enlazar los primero y segundo dominios de enlace al antígeno entre sí, en particular, los dos nanocuerpos entre sí, quedarán claros para la persona experta, y en términos generales, pueden ser cualquier enlazador o espaciador utilizado en la materia para enlazar secuencias de aminoácidos. De preferencia, el enlazador o espaciador es adecuado para utilizarse en la construcción de proteínas o polipéptidos que se pretendan para uso farmacéutico.

Por ejemplo, un enlazador puede ser una secuencia de aminoácidos adecuada, y en particular, las secuencias de aminoácidos de entre 1 y 50, de preferencia de entre 1 y 30, tal como de entre 1 y 10 residuos de aminoácidos. Algunos ejemplos preferidos de estas secuencias de aminoácidos incluyen los enlazadores gly-ser, por ejemplo del tipo (gly_xser_y)_z, tales como, por ejemplo, (gly₄ser)₃ o (gly₃ser₂)₃, como se describen en la Publicación Internacional Número WO 99/42077, y los enlazadores GS30, GS15, GS9 y GS7 descritos en las solicitudes por Ablynx mencionadas en la presente (véanse, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales Números WO 06/040153 y WO 06/122825), así como las regiones de tipo articulación, tales como las regiones de articulación de los anticuerpos de cadena pesada que se presentan naturalmente o secuencias similares (tales como se describen en la Publicación Internacional Número WO 94/04678). Algunos otros posibles enlazadores son poli-alanina (tal como AAA), así como los enlazadores GS30 (SEQ ID NO: 85 en la Publicación Internacional Número WO 06/122825), y GS9 (SEQ ID NO: 84 en la Publicación Internacional Número WO 06/122825).

Los enlazadores preferidos de acuerdo con la invención son los enlazadores peptídicos de entre 3 y 50 aminoácidos de largo, por ejemplo, los enlazadores de una longitud de aminoácidos de 3 a 9, 10 a 15, 16 a 20, 21 a 25, 26 a 35, 36 a 40, 41 a 45 o 46 a 50. En una realización de la invención, el péptido enlazador es de 35 aminoácidos de largo. El enlazador puede consistir en solamente dos aminoácidos diferentes. Como se menciona anteriormente, éstos pueden ser glicina y serina. De una manera alternativa, pueden ser prolina y serina.

En algunas realizaciones de la invención, en particular, en los nanocuerpos biparatópicos de la invención, el péptido enlazador consiste en la secuencia de aminoácidos:

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 220).

Otros enlazadores adecuados comprenden en general compuestos orgánicos o polímeros, en particular, aquéllos adecuados para utilizarse en proteínas para uso farmacéutico. Por ejemplo, las fracciones de poli-(etilenglicol) se han utilizado para enlazar dominios de anticuerpos, véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 04/081026.

Por consiguiente, en otro aspecto, la invención se refiere a una molécula que comprende al menos dos polipéptidos, cuya molécula se dirige contra, o se enlaza a, el receptor de quimiocina CXCR2, en donde un primer polipéptido comprende un primer dominio de enlace al antígeno de inmunoglobulina, y un segundo polipéptido comprende un segundo dominio de enlace al antígeno de inmunoglobulina, en donde los primero y segundo dominios de enlace al antígeno reconocen los primero y segundo epítopos sobre el CXCR2, y en donde los al menos dos polipéptidos se unen mediante un enlazador no peptídico.

De preferencia, en el aspecto de la invención, el primer dominio de enlace al antígeno es capaz de enlazarse a un péptido lineal que consiste en la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 7, y el segundo dominio de enlace al antígeno no es capaz de enlazarse a, o bien se enlaza con una afinidad más baja, al péptido lineal mencionado. De preferencia, el primer epítopo comprende o está dentro de los aminoácidos 1 a 19 del CXCR2 y el segundo epítopo está fuera de los aminoácidos 1 a 19 del CXCR2.

De preferencia, en este aspecto de la invención, los primero y segundo dominios de enlace al antígeno están comprendidos en los únicos dominios variables de inmunoglobulina, en donde los primero y segundo únicos dominios variables de inmunoglobulina son de preferencia nanocuerpos, y en particular, cualquiera de los nanocuerpos específicamente descritos en la presente.

En todos los aspectos de la invención descrita en la presente, una propiedad esencial para el enlazador es que es de una longitud y conformación para permitir que los primero y segundo dominios de enlace al antígeno se enlacen a sus epítopos respectivos sobre el CXCR2.

Los enlazadores utilizados también pueden conferir una o más propiedades favorables diferentes o funcionalidad a los polipéptidos de la invención, y/o pueden proporcionar uno o más sitios para la formación de derivados y/o para la unión de los grupos funcionales (por ejemplo, como se describe en la presente para los derivados de los nanocuerpos biparatópicos de la invención). Por ejemplo, los enlazadores que contienen uno o más residuos de aminoácidos cargados (véase la Tabla A-2 en la página 48 de la Solicitud Internacional Número WO 08/020079) pueden proporcionar mejores propiedades hidrofílicas, mientras que los enlazadores que forman o contienen pequeños epítopos o marcas, se pueden utilizar para los propósitos de detección, identificación y/o purificación. Nuevamente, basándose en la divulgación de la presente, la persona experta podrá determinar los enlazadores óptimos para utilizarse en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

Cuando se utilizan dos o más enlazadores en los polipéptidos de la invención, estos enlazadores pueden ser iguales o diferentes. Nuevamente, basándose en la divulgación de la presente, la persona experta podrá determinar los enlazadores óptimos para utilizarse en un polipéptido específico de la invención, opcionalmente después de algunos experimentos de rutina limitados.

Ahora se ha encontrado, de una manera sorprendente, que el suero de algunos individuos contiene moléculas de IgG que pueden interactuar con los nanocuerpos de CXCR2 de la invención, aunque estos individuos no han sido anteriormente expuestos a los nanocuerpos. Se ha encontrado que esto se debe a una interacción de las moléculas de IgG con un epítopo conformacional en el dominio Vh humanizado, una región normalmente enmascarada en los anticuerpos por el dominio CH1. Con el objeto de superar este problema, la presente invención proporciona nanocuerpos biparatópicos específicos para CXCR2, los cuales incluyen una extensión C-terminal. Se ha encontrado que esta extensión C-terminal inhibe eficientemente la interacción de enlace entre las moléculas de IgG y el nanocuerpo. Los inventores han encontrado que, con el objeto de bloquear esta interacción, se pueden agregar diversas extensiones C-terminales (A, AA, AS, AST, ASTKP, GGGS) a la secuencia del nanocuerpo. La extensión C-terminal preferida es de dos residuos de alanina (AA).

Usualmente, para mayor facilidad de expresión y producción, un polipéptido de la invención será un polipéptido lineal. Sin embargo, la invención, en su sentido más amplio, no está limitada a lo mismo. Por ejemplo, cuando un polipéptido de la invención comprende tres o más nanocuerpos, es posible enlazarlos mediante el uso de un enlazador con tres o más "brazos", enlazándose cada "brazo" a un nanocuerpo, como para proporcionar una construcción "en forma de estrella". También es posible, aunque usualmente menos preferido, utilizar construcciones circulares.

En particular, se puede preparar cualquier configuración de dos o más nanocuerpos con uno o más enlazadores, como se identifican anteriormente. Por ejemplo, se puede idear un nanocuerpo biespecífico biparatópico, el cual

comprenda dos dominios de enlace de inmunoglobulina dirigidos contra, o que se enlacen al, CXCR2, y uno o más dominios de enlace de inmunoglobulina dirigidos contra, o que se enlacen a, la albúmina de suero humano (HSA), y este dominio de enlace de la albúmina de suero humano (HSA) puede estar comprendido de un nanocuerpo que esté enlazado a los nanocuerpos de enlace de CXCR2 en cualquier posición, por ejemplo, entre dos nanocuerpos de enlace de CXCR2, por medio de los enlazadores como se definen en la presente.

5 Los presentes inventores han preparado polipéptidos biparatópicos de acuerdo con la invención. Las secuencias de aminoácidos de los nanocuerpos multivalentes y biparatópicos anti-CXCR2 se muestran en la Tabla 13 entre los Ejemplos de la presente. De éstos, los polipéptidos particularmente preferidos de acuerdo con la invención son los nanocuerpos biparatópicos designados en la Tabla 13 como 163D2 -127D1, 163E3 -127D1, 163E3-54B12, 163D2-54B12, 2B2-163E3, 2B2-163D2, 97A9-2B2, 97A9-54B12, 127D1-163D2, 127D1-163E3, 2B2-97A9, 54B12-163D2, 10 54B12-163E3, 163D2-2B2 y 163E3,-2B2, así como 127D1-97A9, 54B12-97A9 y 97A9-127D1, y las variantes de secuencia optimizada de los mismos. Todos estos nanocuerpos biparatópicos comprenden un primer nanocuerpo que comprende un primer dominio de enlace al antígeno que es capaz de enlazarse a un péptido lineal que consiste en la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 7 (aminoácidos 1-19 del CXCR2), y un segundo nanocuerpo que comprende un segundo dominio de enlace al antígeno que no es capaz de enlazarse, o bien se enlaza con una afinidad más baja, al péptido lineal mencionado (véase la Tabla 8). De acuerdo con la invención, se prefieren particularmente 163D2-127D1, 163E3-127D1, 163E3-54B12, 163D2-54B12, 2B2-163E3, 2B2-163D2, 15 97A9-2B2 y 97A9-54B12.

20 Como ya se discutió en la presente, es deseable que los nanocuerpos biparatópicos preferidos de la invención, incluyendo las realizaciones específicas y variantes de los mismos, designadas como 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 o 163E3/2B2 tengan, dentro de sus regiones de estructura, al menos una sustitución de aminoácido optimizante de la secuencia, y las regiones de estructura pueden ser parcialmente o completamente humanizadas, por ejemplo. Es deseable que el grado de optimización de secuencia dé como resultado el nanocuerpo biparatópico que tenga del 80 al 90 % de identidad de secuencia al menos con respecto a las regiones de estructura, con las SEQ ID NOs: 58, 59, 62, 63, 64, 25 65, 47, 61, 53, 54, 46, 69, 68, 67 o 66.

30 Las realizaciones de la invención comprenden además los polipéptidos en donde el primer dominio de enlace al antígeno se selecciona a partir de las SEQ ID NOs: 213, 214, 216 y 219, o un polipéptido que tiene al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad con una de las mismas, y el segundo dominio de enlace al antígeno se selecciona a partir de las SEQ ID NOs: 215, 217 y 218, o un polipéptido que tiene al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad con una de las mismas.

(0079-0076)

35 En una realización de la invención, en el polipéptido que comprende la segunda inmunoglobulina de un único dominio variable, la CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en la SEQ ID NO: 141, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 236, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 181, y en el que comprende además la primera inmunoglobulina de un único dominio variable, la CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en la SEQ ID NO: 146, la CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 237, y la CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 186. En las realizaciones adicionales, las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos estipuladas en las SEQ ID NOs: 141, 236, 181, 146, 237 o 186.

45 En una realización adicional, el polipéptido comprende secuencias de aminoácidos que difieren de aquéllas estipuladas en las SEQ ID NOs: 141, 236, 181, 146, 237 o 186, solamente en los cambios de aminoácidos conservadores.

50 En una realización adicional, el polipéptido comprende un primer dominio de enlace al antígeno seleccionado a partir de la SEQ ID NO: 216, o un polipéptido que tiene al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 216, y el segundo dominio de enlace al antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID NO: 217, o un polipéptido que tiene al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 217.

En todavía una realización adicional, el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 221.

(0079-0086)

55 En una realización de la invención, en el polipéptido que comprende la segunda inmunoglobulina de un único dominio variable, la CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en la SEQ ID NO: 141, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 236, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 181, y en el que comprende además la primera inmunoglobulina de un único dominio variable, la CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula

en la SEQ ID NO: 145, la CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 165, y la CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 185. En las realizaciones adicionales, las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos estipuladas en las SEQ ID NOs: 141, 236, 181, 145, 165 o 185.

5 En una realización adicional, el polipéptido comprende secuencias de aminoácidos que difieren de aquéllas estipuladas en las SEQ ID NOs: 141, 236, 181, 145, 165 o 185 solamente en los cambios de aminoácidos conservadores.

10 En una realización adicional, el polipéptido comprende un primer dominio de enlace al antígeno seleccionado a partir de la SEQ ID NO: 216, o un polipéptido que tiene al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 216, y el segundo dominio de enlace al antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID NO: 218, o un polipéptido que tiene al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 218.

En todavía una realización adicional, el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 222.

15 (0079-0061)

En una realización de la invención, en el polipéptido que comprende la segunda inmunoglobulina de un único dominio variable, la CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en la SEQ ID NO: 141, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 236, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 181, y en el que comprende además la primera 20 inmunoglobulina de un único dominio variable, la CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en la SEQ ID NO: 143, la CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 235, y la CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 183. En las realizaciones adicionales, las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad de aminoácidos con cualquiera de las 25 secuencias de aminoácidos estipuladas en las SEQ ID NOs: 141, 236, 181, 143, 235 o 183.

En una realización adicional, el polipéptido comprende secuencias de aminoácidos que difieren de aquéllas estipuladas en las SEQ ID NOs: 141, 236, 181, 143, 235 o 183 solamente en los cambios de aminoácidos conservadores.

30 En una realización adicional, el polipéptido comprende un primer dominio de enlace al antígeno seleccionado a partir de la SEQ ID NO: 216, o un polipéptido que tiene al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 216, y el segundo dominio de enlace al antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID NO: 215, o un polipéptido que tiene al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 215, separado por un enlazador con la SEQ ID NO: 220.

(0104-0076)

35 En una realización de la invención, en el polipéptido que comprende la segunda inmunoglobulina de un único dominio variable, la CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en la SEQ ID NO: 151, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 171, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 191, y en el que comprende además la primera 40 inmunoglobulina de un único dominio variable, la CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en la SEQ ID NO: 146, la CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 237, y la CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 186. En las realizaciones adicionales, las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos estipuladas en las SEQ ID NOs: 151, 171, 191, 146, 237 o 186.

45 En una realización adicional, el polipéptido comprende secuencias de aminoácidos que difieren de aquéllas estipuladas en las SEQ ID NOs: 151, 171, 191, 146, 237 o 186, solamente en los cambios de aminoácidos conservadores.

50 En una realización adicional, el polipéptido comprende un primer dominio de enlace al antígeno seleccionado a partir de la SEQ ID NO: 219, o un polipéptido que tiene al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 219, y el segundo dominio de enlace al antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID NO: 217, o un polipéptido que tiene al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 217.

En todavía una realización adicional, el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 223.

(0104-0086)

En una realización de la invención, en el polipéptido que comprende la segunda inmunoglobulina de un único dominio variable, la CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en la SEQ ID NO: 151, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 171, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 191, y en el que comprende además la primera

5 inmunoglobulina de un único dominio variable, la CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en la SEQ ID NO: 145, la CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 165, y la CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 185. En las realizaciones adicionales, las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad de aminoácidos con cualquiera de las

10 secuencias de aminoácidos estipuladas en las SEQ ID NOs: 151, 171, 191, 145, 165 o 185.

En una realización adicional, el polipéptido comprende secuencias de aminoácidos que difieren de aquéllas estipuladas en las SEQ ID NOs: 151, 171, 191, 145, 165 o 185 solamente en los cambios de aminoácidos conservadores.

15 En una realización adicional, el polipéptido comprende un primer dominio de enlace al antígeno seleccionado a partir de la SEQ ID NO: 219, o un polipéptido que tiene al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 219, y el segundo dominio de enlace al antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID NO: 218, o un polipéptido que tiene al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 218.

En todavía una realización adicional, el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 224.

20 (0104-0061)

En una realización de la invención, en el polipéptido que comprende la segunda inmunoglobulina de un único dominio variable, la CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en la SEQ ID NO: 151, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 171, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 191, y en el que comprende además la primera

25 inmunoglobulina de un único dominio variable, la CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en la SEQ ID NO: 143, la CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 235, y la CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 183. En las realizaciones adicionales, las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad de aminoácidos con cualquiera de las

30 secuencias de aminoácidos estipuladas en las SEQ ID NOs: 151, 171, 191, 143, 235 o 183.

En una realización adicional, el polipéptido comprende secuencias de aminoácidos que difieren de aquéllas estipuladas en las SEQ ID NOs: 151, 171, 191, 143, 235 o 183 solamente en los cambios de aminoácidos conservadores.

35 En una realización adicional, el polipéptido comprende un primer dominio de enlace al antígeno seleccionado a partir de la SEQ ID NO: 219, o un polipéptido que tiene al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 219, y el segundo dominio de enlace al antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID NO: 215, o un polipéptido que tiene al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 215, separado por un enlazador con la SEQ ID NO: 220.

40 En otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos, y en particular, únicos dominios variables de inmunoglobulina, tales como un dominio V_{HH} o nanocuerpo, que son monovalentes con respecto al enlace de CXCR2 y que son bloques de construcción para los polipéptidos biparatópicos de la invención, y se pueden considerar como intermediarios en el proceso de su producción. Los únicos dominios variables de inmunoglobulina monovalentes preferidos son los polipéptidos con las SEQ ID NOs: 25 a 43 y 90 mostradas en la Tabla 9, o los polipéptidos con al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con cualquiera de las SEQ ID NOs: 25 a 43 y 90.

45 Un polipéptido monovalente preferido es el designado como 137B7, y que comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 36, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, o al menos el 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 36. En una realización preferida, las regiones de estructura de la SEQ ID NO: 36 tienen una o más sustituciones de aminoácidos de optimización de la secuencia. Otros polipéptidos monovalentes preferidos son aquéllos designados como 127D1, 2B2, 54B12, 97A9, 163D2 y 163E3, incluyendo aquéllos en los que se ha optimizado la secuencia en las regiones de estructura.

50 Por ejemplo, el 127D1 puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, en donde se han hecho una o más sustituciones de optimización de secuencia de aminoácidos, como se contempla en la Tabla 26, y de preferencia, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 216.

55 El 2B2 puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43, en donde se han hecho una o más sustituciones de optimización de secuencia, como se contempla en la Tabla 20, y de preferencia, el polipéptido

comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 213 o 214.

El 54B12 puede comprender la SEQ ID NO: 90, en donde se han hecho una o más sustituciones de optimización de secuencia, como se contempla en la Tabla 30, y de preferencia, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 219.

5 El 97A9 puede comprender la SEQ ID NO: 39 en donde se han hecho una o más sustituciones de optimización de secuencia, como se contempla en la Tabla 22, y de preferencia, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 215.

10 El 163D2 puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41, en donde se han hecho una o más de las sustituciones de optimización de secuencia, como se contempla en la Tabla 28, y de preferencia, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 218.

El 163E3 puede comprender la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 42 en donde se han hecho una o más sustituciones de optimización de secuencia, como se contempla en la Tabla 24, y de preferencia, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 217.

15 Dentro de este aspecto de la invención también se abarcan los polipéptidos monovalentes, en particular, los únicos dominios variables de inmunoglobulina, tales como los nanocuerpos que son capaces de bloquear cruzadamente el enlace al CXCR2 con un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos estipulada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47 o 61.

20 Cualquiera de los nanocuerpos monovalentes preferidos discutidos anteriormente y, en particular, el 137B7, se puede utilizar para las aplicaciones mencionadas en la presente, por ejemplo, en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).

Los polipéptidos biparatópicos de acuerdo con la invención, en particular, los únicos dominios variables de inmunoglobulina biparatópicos preferidos discutidos anteriormente, incluyendo todas las versiones camelizadas y humanizadas de los mismos, son moduladores del CXCR2, y en particular, inhiben la transducción de señales del CXCR2.

25 De preferencia, las secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) y las secuencias de región de estructura (FR) en los polipéptidos biparatópicos, en particular, en los únicos dominios variables de inmunoglobulina biparatópicos de la invención, son tales que:

30 - se enlanzan al CXCR2 con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, y de preferencia de 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos, y de una manera muy preferible de 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro (es decir, con una constante de asociación (K_A) de 10^5 a 10^{12} litros/mol o más, y de preferencia de 10^7 a 10^{12} litros/mol o más, y de una manera muy preferible de 10^8 a 10^{12} litros/mol);

y/o son tales que:

35 - se enlanzan al CXCR2 con un índice $k_{activada}$ de entre $10^2 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ y aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$, de preferencia de entre $10^3 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$, más preferiblemente de entre $10^4 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$, tal como de entre $10^5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$;

y/o son tales que:

- se enlanzan al CXCR2 con un índice $k_{desactivada}$ de entre 1 s^{-1} ($t_{1/2}=0.69 \text{ s}$) y 10^{-6} s^{-1} (proporcionando un complejo casi irreversible con un $t_{1/2}$ de múltiples días), de preferencia de entre 10^{-2} s^{-1} y 10^{-6} s^{-1} , más preferiblemente de entre 10^{-3} s^{-1} y 10^{-6} s^{-1} , tal como de entre 10^{-4} s^{-1} y 10^{-6} s^{-1} .

40 De preferencia, las secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) y las secuencias de región de estructura (FR) presentes en los polipéptidos y en los únicos dominios variables de inmunoglobulina biparatópicos de la invención, son tales que se enlanzan al CXCR2 con una afinidad menor de 500 nM, de preferencia menor de 200 nM, más preferiblemente menor de 10 nM, tal como menor de 500 pM.

45 En particular, como se muestra en los Ejemplos en la presente, los nanocuerpos biparatópicos preferidos de la invención son capaces de inhibir el enlace de Gro- α al CXCR2 humano con una IC₅₀ menor de 20 nM. Los nanocuerpos biparatópicos preferidos de acuerdo con la invención también pueden inhibir la liberación de Ca (Gro- α) inducida por el agonista a partir del CXCR2 que lleva las células RBL con una IC₅₀ de menos de 100 nM. Los nanocuerpos biparatópicos preferidos de acuerdo con la invención también pueden inhibir la acumulación de (Gro- α) [³⁵S]GTPyS inducida por el agonista en las membranas de CXCR2-CHO con una IC₅₀ de menos de 50 nM. Los nanocuerpos biparatópicos preferidos de la invención también pueden inhibir el cambio de forma de los glóbulos blancos sanguíneos humanos cuando se exponen a Gro- α con una IC₅₀ de menos de < 1 nM, o el cambio de forma de los glóbulos blancos sanguíneos de cinomolgo con una IC₅₀ de menos de < 2 nM.

De acuerdo con un aspecto muy preferido de la invención, un polipéptido biparatópico de la invención, tal como un

único dominio variable de inmunoglobulina biparatópico, por ejemplo, un nanocuerpo como se describe en la presente, bloqueará cruzadamente el enlace al polipéptido de CXCR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, con cualquiera o todos los polipéptidos estipulados en las SEQ ID NOS: 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47 o 61. El bloqueo cruzado se puede medir mediante cualquiera de los métodos bien conocidos por los expertos en este campo.

Para uso farmacéutico, los polipéptidos de la invención de preferencia se dirigen contra el CXCR2 humano, por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se estipula en la SEQ ID NO: 1; mientras que, para propósitos veterinarios, los polipéptidos de la invención de preferencia se dirigen contra el CXCR2 de la especie que se vaya a tratar, o que al menos reaccionen cruzadamente con el CXCR2 de la especie que se vaya a tratar.

Adicionalmente, un polipéptido biparatópico de la invención opcionalmente, y en adición a los al menos dos dominios de enlace al antígeno para el enlace contra el CXCR2, pueden contener uno o más sitios o dominios de enlace adicionales para el enlace contra otros epítopos, antígenos, proteínas u objetivos.

La eficacia de los polipéptidos de la invención, y de las composiciones que los comprenden, se puede probar utilizando cualquier ensayo *in vitro* adecuado, ensayo basado en células, ensayo *in vivo*, y/o modelo animal conocido por sí mismo, o cualquier combinación de los mismos, adecuado para indicar que el polipéptido puede ser útil para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o de cualquier otra enfermedad que involucre la transducción aberrante de señales del CXCR2. Los ensayos y modelos animales adecuados quedarán claros para la persona experta.

También, de acuerdo con la invención, los polipéptidos que se dirigen contra el CXCR2 humano pueden o no mostrar reactividad cruzada con el CXCR2 a partir de una o más especies diferentes de animales de sangre caliente. Sin embargo, de preferencia, los polipéptidos de la invención dirigidos contra el CXCR2 humano mostrarán reactividad cruzada con el CXCR2 a partir de una o más especies diferentes de primates (tales como, sin limitación, monos del género *Macaca* (tales como, y en particular, monos cinomolgos (*Macaca fascicularis*) y/o monos rhesus (*Macaca mulatta*)), y babuinos (*Papio ursinus*)) para los propósitos de probar la toxicidad. La reactividad cruzada preferida es con el CXCR2 a partir de monos cinomolgos. Puede ser deseable la reactividad cruzada con una o más especies de animales que se utilizan con frecuencia en modelos animales para enfermedades (por ejemplo ratón, rata, conejo, cerdo o perro), y en particular, en los modelos animales para las enfermedades y los trastornos asociados con el CXCR2. En este aspecto, quedará claro para la persona experta que dicha reactividad cruzada, cuando está presente, puede tener ventajas desde un punto de vista del desarrollo de fármacos, debido a que permite que se prueben las secuencias de aminoácidos y polipéptidos contra el CXCR2 humano en esos modelos de enfermedad.

En términos más generales, los polipéptidos de la invención que reaccionan cruzadamente con el CXCR2 a partir de múltiples especies de mamífero usualmente serán convenientes para utilizarse en las aplicaciones veterinarias, debido a que esto permitirá que se utilice el mismo polipéptido a través de múltiples especies.

De preferencia, los polipéptidos biparatópicos de la invención no reaccionan cruzadamente con el CXCR1 o CXCR4.

En los polipéptidos biparatópicos de la invención, al menos un sitio de enlace al antígeno se puede dirigir contra un sitio de interacción, es decir, un sitio en donde el CXCR2 interactuaría con otra molécula, por ejemplo, su ligando o sus ligandos naturales.

El polipéptido biparatópico, por ejemplo, el único dominio variable de inmunoglobulina de la invención, puede ser tal que el segundo dominio de enlace al antígeno no se enlace al péptido lineal de la SEQ ID NO: 7 y reconozca un epítopo que comprenda, o que esté dentro de, los péptidos estipulados en la presente como las SEQ ID NOS: 8, 9, 10, 11 o 12. En adición, el primer dominio de enlace al antígeno puede reconocer un epítopo que comprenda, o que esté dentro de, el péptido de la SEQ ID NO: 7.

En las realizaciones de la invención que reaccionan cruzadamente con el CXCR2 de mono cinomolgo, el primer dominio de enlace al antígeno también reconoce un epítopo que comprende, o que esté dentro de, el péptido de la SEQ ID NO: 4. El segundo dominio de enlace al antígeno, en esta realización, puede reconocer un epítopo que comprende, o que esté dentro de, los péptidos de la SEQ ID NO: 5 o 6.

Dentro del alcance de la invención, también se proporcionan tipos de polipéptidos biparatópicos, en particular, los nanocuerpos biparatópicos que se enlazarán en general a todos los análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos que se presenten naturalmente o sintéticos del CXCR2; o al menos a los análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos del CXCR2 que contengan uno o más determinantes antigenicos o epítopos que sean esencialmente iguales a los determinantes antigenicos o epítopos con los que se enlacen los polipéptidos de la invención en el CXCR2 (por ejemplo, en el CXCR2 de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 1). En este caso, los polipéptidos de la invención se pueden enlazar a estos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos con una afinidad y/o especificidad que sea igual que, o que sea diferente de (es decir, más alta que, o más baja que), las afinidades y especificaciones discutidas anteriormente, con que se enlazan los polipéptidos de la invención al CXCR2 (de tipo silvestre).

También, como quedará claro para la persona experta, los polipéptidos que son biparatópicos se enlazan con más alta avidez al CXCR2 que un polipéptido de un único dominio de enlace al antígeno correspondiente.

5 También está dentro del alcance de la invención utilizar partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos y/o derivados de los polipéptidos biparatópicos, en particular, los únicos dominios variables de inmunoglobulina biparatópicos de la invención, en los diferentes contextos terapéuticos discutidos en la presente, en el entendido de que siempre incluyan los dominios funcionales relevantes equivalentes al polipéptido completo. Tales partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos o derivados, pueden tener todas las características funcionales discutidas anteriormente para los polipéptidos biparatópicos de la invención.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a los únicos dominios variables de inmunoglobulina biparatópicos que opcionalmente comprenden además uno o más grupos, residuos, fracciones o unidades de enlace diferentes. Estos grupos, residuos, fracciones, unidades de enlace o secuencias de aminoácidos adicionales pueden o no proporcionar funcionalidad adicional al polipéptido de la invención, y pueden o no modificar las propiedades del mismo.

15 Por ejemplo, estos grupos, residuos, fracciones o unidades de enlace adicionales pueden ser una o más secuencias de aminoácidos adicionales, de tal manera que la invención sea una proteína (de fusión) o un polipéptido (de fusión). En un aspecto preferido, pero no limitante, el uno o más grupos, residuos, fracciones o unidades de enlace diferentes son secuencias de inmunoglobulina. Todavía más preferiblemente, el uno o más grupos, residuos, fracciones o unidades de enlace diferentes se seleccionan a partir del grupo que consiste en anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos que sean adecuadas para utilizarse como un anticuerpo de dominio, anticuerpos de un solo dominio, secuencias de aminoácidos que sean adecuadas para utilizarse como un anticuerpo de un solo dominio, "dAbs", secuencias de aminoácidos que sean adecuadas para utilizarse como un dAb, o nanocuerpos.

20 De una manera alternativa, estos grupos, residuos, fracciones o unidades de enlace, por ejemplo, pueden ser grupos químicos, residuos, o fracciones, los cuales pueden ser o no por sí mismos biológicamente y/o farmacológicamente activos. Por ejemplo, estos grupos se pueden enlazar al uno o más polipéptidos de la invención, tal como para proporcionar un "derivado" de un polipéptido de la invención, como se describe adicionalmente en la presente.

25 En estas construcciones, el uno o más polipéptidos de la invención y el uno o más grupos, residuos, fracciones o unidades de enlace, se pueden enlazar directamente unos a otros y/o por medio de uno o más enlazadores o espaciadores adecuados. Por ejemplo, cuando el uno o más grupos, residuos, fracciones o unidades de enlace son secuencias de aminoácidos, los enlazadores también pueden ser secuencias de aminoácidos, de tal manera que la construcción resultante sea una (proteína de) fusión o un (polipéptido de) fusión.

30 Como quedará claro a partir de la descripción adicional anterior y en la presente, esto significa que los polipéptidos biparatópicos de la invención se pueden utilizar como un "bloque de construcción" para formar polipéptidos adicionales de la invención, es decir, mediante su combinación adecuadamente con otros grupos, residuos, fracciones o unidades de enlace, con el objeto de formar las construcciones como se describen en la presente, las cuales son multiparatópicas y opcionalmente multivalentes o multiespecíficas, bi/multivalentes y bi/multiespecíficas.

35 Los polipéptidos de este aspecto de la invención se pueden preparar en términos generales mediante un método que comprende al menos un paso de enlazar adecuadamente el uno o más polipéptidos de la invención al uno o más grupos, residuos, fracciones o unidades de enlace adicionales, opcionalmente por medio del uno o más enlazadores adecuados.

40 En un aspecto específico de la invención, el polipéptido biparatópico de la invención se modifica para tener un aumento en su vida media, comparándose con el polipéptido no modificado correspondiente de la invención. Algunos polipéptidos preferidos llegarán a quedar claros para la persona experta basándose en la divulgación adicional en la presente, y, por ejemplo, comprenden las secuencias de aminoácidos o polipéptidos de la invención que se han modificado químicamente para aumentar la vida media de las mismas (por ejemplo, por medio de pegilación, pasilación o hesilación); los polipéptidos de la invención pueden comprender al menos un sitio de enlace adicional para enlazarse a una proteína de suero (tal como albúmina de suero); o los polipéptidos de la invención pueden comprender al menos una secuencia de aminoácidos que se enlace al menos a una fracción (y en particular, al menos a una secuencia de aminoácidos) que aumente la vida media del polipéptido de la invención. Los ejemplos de los polipéptidos de la invención que comprenden las fracciones o secuencias de aminoácidos que prolongan la vida media incluyen los polipéptidos que se enlanzan adecuadamente a una o más proteínas de suero, o fragmentos de las mismas (tales como albúmina de suero (humano) o los fragmentos adecuados de la misma), o a una o más unidades de enlace que puedan enlazarse a las proteínas de suero (tales como, por ejemplo, anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos que sean adecuadas para utilizarse como un anticuerpo de dominio, anticuerpos de un solo dominio, secuencias de aminoácidos que sean adecuadas para utilizarse como un anticuerpo de un solo dominio, "dAbs", secuencias de aminoácidos que sean adecuadas para utilizarse como un dAb, o nanocuerpos que puedan enlazarse a las proteínas de suero, tales como albúmina de suero (tal como albúmina de suero humano), inmunoglobulinas de suero, tales como IgG, o transferrina; polipéptidos que se enlanzan a una porción Fc (tal como un Fc humano) o una parte o fragmento adecuado de los mismos. Los polipéptidos de la

invención que se enlazan a una o más proteínas pequeñas o péptidos que puedan enlazarse a las proteínas de suero (tales como, sin limitación, las proteínas y los péptidos descritos en las Publicaciones Internacionales Números WO 91/01743, WO 01/45746, y WO 02/076489 y en la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica de Ablynx N.V. titulada como "*Peptides capable of binding to serum proteins*" de Ablynx N.V.,

5 presentada el 5 de Diciembre de 2006 (véase también la Publicación Internacional Número WO 2008/068280) también se incorporan dentro de la invención. Una de las técnicas más ampliamente empleadas para aumentar la vida media y/o para reducir la inmunogenicidad de las proteínas farmacéuticas comprende la unión de un polímero farmacológicamente aceptable adecuado, tal como poli-(etilenglicol) (PEG) o derivados del mismo (tales como metoxi-poli-(etilenglicol) o mPEG). En términos generales, se puede utilizar cualquier forma adecuada de pegilación, 10 tal como la pegilación utilizada en la materia para anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (incluyendo, pero no limitándose a, anticuerpos de (un solo) dominio y ScFvs); se hace referencia, por ejemplo, a Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); a Veronese y Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003), a Harris y Chess, Nat. Rev. Drug. Discov., 2, (2003), y a la Publicación Internacional Número WO 04/060965. También hay diferentes 15 reactivos para la pegilación de proteínas son comercialmente disponibles, por ejemplo, en Nektar Therapeutics, EUA.

De preferencia, se utiliza la pegilación dirigida al sitio, en particular, por medio de un residuo de cisteína (véase, por ejemplo, Yang et al., Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003)). Por ejemplo, para este propósito, el PEG se puede unir a un residuo de cisteína que se presente naturalmente en un nanocuerpo biparatópico de la invención. Un polipéptido biparatópico de la invención se puede modificar de tal manera que se introduzcan adecuadamente 20 uno o más residuos de cisteína para la unión del PEG, o se puede fusionar una secuencia de aminoácidos que comprenda uno o más residuos de cisteína para la unión del PEG, con el término N y/o C de un polipéptido biparatópico, todos empleando las técnicas de diseño de proteínas conocidas por sí mismas por la persona experta.

De preferencia, para los únicos dominios variables de inmunoglobulina biparatópicos y los polipéptidos de la invención, se utiliza un PEG con un peso molecular de más de 5,000, tal como de más de 10,000 y menos de 25 200,000, tal como de menos de 100,000; por ejemplo, en el intervalo de 20,000 a 80,000.

La pegilación se puede aplicar a uno o ambos de los dominios variables de inmunoglobulina y/o a cualquier región enlazadora de péptidos. Las técnicas de pegilación adecuadas se describen en la Patente Europea Número EP 1639011.

30 Como una alternativa al PEG, la vida media se puede prolongar mediante una técnica conocida como Hesilación, la cual involucra la unión de derivados de almidón de hidroxi-etilo (HES) a los polipéptidos de la invención. El almidón de hidroxi-etilo (HES) utilizado es una amilopectina derivada a partir de almidón de maíz ceroso que se haya modificado por medio de hidrólisis de ácido para ajustar el peso molecular y en donde los residuos de glucosa se hayan hidroxi-etilado. Otros detalles se pueden obtener en Pavisic R et al., Int J Pharm (2010) 15 de Marzo, 387 (1-2): 110-9.

35 40 En términos generales, los polipéptidos de la invención con un aumento en la vida media de preferencia tienen una vida media que es al menos 1.5 veces, de preferencia al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo, al menos 10 veces o más de 20 veces, mayor que la vida media del polipéptido correspondiente de la invención por sí mismo. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención con un aumento en la vida media pueden tener una vida media que aumente con más de 1 hora, de preferencia más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 o 72 horas, comparándose con el polipéptido correspondiente de la invención por sí misma.

45 En un aspecto preferido de la invención, los polipéptidos de la invención tienen una vida media en suero que aumenta con más de 1 hora, de preferencia más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 o 72 horas, comparándose con los polipéptidos correspondientes de la invención por sí mismos.

50 En otro aspecto preferido de la invención, los polipéptidos de la invención exhiben una vida media en suero en el ser humano, de al menos aproximadamente 12 horas, de preferencia de al menos 24 horas, más preferiblemente de al menos 48 horas, todavía más preferiblemente de al menos 72 horas o más. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención pueden tener una vida media de al menos 5 días (tal como de aproximadamente 5 a 10 días), de preferencia de al menos 9 días (tal como de aproximadamente 9 a 14 días), más preferiblemente de al menos aproximadamente 10 días (tal como de aproximadamente 10 a 15 días), o de al menos aproximadamente 11 días (tal como de aproximadamente 11 a 16 días), más preferiblemente de al menos aproximadamente 12 días (tal como de aproximadamente 12 a 18 días o más), o más de 14 días (tal como de aproximadamente 14 a 19 días).

55 La invención se refiere además a métodos para la preparación o generación de los polipéptidos, ácidos nucleicos, células huésped y composiciones de la invención, como se describen en la presente.

En términos generales, estos métodos pueden comprender los pasos de:

a) proporcionar un conjunto, una colección, o una biblioteca de polipéptidos; y

b) rastrear el conjunto, la colección, o la biblioteca de polipéptidos para encontrar las secuencias de aminoácidos que puedan enlazarse a, y/o que puedan tener afinidad por, el CXCR2; y

c) aislar las secuencias de aminoácidos que puedan enlazarse a, y/o que tengan afinidad por, el CXCR2.

5 El conjunto, la colección, o la biblioteca de polipéptidos puede ser un conjunto, una colección, o una biblioteca de secuencias de inmunoglobulina (como se describen en la presente), tal como un conjunto, una colección, o una biblioteca pura de secuencias de inmunoglobulina; un conjunto, una colección, o una biblioteca sintética o semi-sintética de secuencias de inmunoglobulina; y/o un conjunto, una colección, o una biblioteca de secuencias de inmunoglobulina que se hayan sometido a maduración de afinidad.

10 También, en este método, el conjunto, la colección, o la biblioteca de polipéptidos puede ser un conjunto, una colección, o una biblioteca de dominios variables de cadena pesada (tales como dominios V_H o dominios V_{HH}) o de dominios variables de cadena ligera. Por ejemplo, el conjunto, la colección, o la biblioteca de polipéptidos puede ser un conjunto, una colección, o una biblioteca de los anticuerpos de dominio o de los anticuerpos de un solo dominio, o puede ser un conjunto, una colección, o una biblioteca de secuencias de aminoácidos que sean capaces de funcionar como un anticuerpo de dominio o como un anticuerpo de un solo dominio.

15 En un aspecto preferido de este método, el conjunto, la colección, o la biblioteca de polipéptidos puede ser un conjunto, una colección, o una biblioteca inmunitaria de secuencias de inmunoglobulina, por ejemplo, derivadas a partir de un mamífero, por ejemplo, una llama, que se haya inmunizado adecuadamente con el CXCR2 o con un determinante antigénico adecuado basado en el mismo o derivado del mismo, tal como una parte, un fragmento, una región, un dominio, un ciclo, u otro epítopo antigénico del mismo.

20 En los métodos anteriores, el conjunto, la colección, o la biblioteca de péptidos o polipéptidos se puede exhibir sobre un fago, fagémido, ribosoma o microorganismo adecuado (tal como levadura), tal como para facilitar el rastreo. Los métodos, técnicas, y organismos huésped adecuados para exhibir y rastrear (un conjunto, una colección, o una biblioteca de) secuencias de aminoácidos, quedarán claros para la persona experta en este campo, por ejemplo, con base en la divulgación adicional en la presente. También se hace referencia a la reseña por Hoogenboom en *Nature Biotechnology*, 23, 9, 1105-1116 (2005).

25 En otro aspecto, el método para la generación de los polipéptidos para utilizarse en la construcción del polipéptido biparatópico de acuerdo con la invención, comprende al menos los pasos de:

a) proporcionar una colección o una muestra de las células que expresen los polipéptidos;

b) rastrear la colección o la muestra de las células para encontrar las células que expresen un polipéptido que pueda enlazarse a, y/o que pueda tener afinidad por el, CXCR2; y

30 c) cualquiera de (i) aislar el polipéptido mencionado; o (ii) aislar a partir de la célula mencionada, una secuencia de ácido nucleico que codifique este polipéptido, seguido por expresar el polipéptido.

35 Por ejemplo, cuando el polipéptido deseado es una secuencia de inmunoglobulina, la colección o la muestra de las células, por ejemplo, puede ser una colección o una muestra de células-B. También, en este método, la muestra de las células se puede derivar a partir de un mamífero, por ejemplo, de una llama, que se haya inmunizado adecuadamente con el CXCR2 o con un determinante antigénico adecuado basado en el mismo o derivado del mismo, tal como una parte, un fragmento, una región, un dominio, un ciclo, u otro epítopo antigénico del mismo. En un aspecto particular, el determinante antigénico puede ser una parte, región, dominio, o ciclo extracelular, u otros epítopos extracelulares.

40 En la preparación de los nanocuerpos biparatópicos preferidos de la invención identificados en la presente, las llamas se inmunizaron con células de mamífero que expresaban el CXCR2 humano, con células de mamífero que expresaban el CXCR2 de cinomolgo, con ADN que codificaba el CXCR2 humano de longitud completa, con ADN que codificaba el CXCR2 Δ1-17 humano, con ADN que codificaba el CXCR2 de cinomolgo, y los péptidos estipulados en la Tabla 5

45 El método de rastreo como se describe anteriormente, se puede llevar a cabo de cualquier manera adecuada, como quedará claro para la persona experta. Se hace referencia, por ejemplo, a la Patente Europea Número EP 0 542 810, a las Publicaciones Internacionales Números WO 05/19824, WO 04/051268 y WO 04/106377. El rastreo del paso b) de preferencia se lleva a cabo utilizando una técnica de citometría de flujo, tal como FACS. Para esto, se hace referencia, por ejemplo, a Lieby et al., *Blood*, Volumen 97, Número 12, 3820 (2001).

50 En otro aspecto, el método para la generación de un polipéptido dirigido contra el CXCR2 para utilizarse en la construcción de un polipéptido de acuerdo con la invención, puede comprender al menos los pasos de:

a) proporcionar un conjunto, una colección, o una biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen el polipéptido;

b) rastrear el conjunto, la colección, o la biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos para encontrar las secuencias

de ácidos nucleicos que codifiquen una secuencia de aminoácidos que pueda enlazarse a, y/o que tenga afinidad por, el CXCR2; y

- c) aislar la secuencia de ácido nucleico, seguido por expresar el polipéptido.

En este método, el conjunto, la colección, o la biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido, por ejemplo, puede ser un conjunto, una colección, o una biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen un conjunto, una colección, o una biblioteca pura de secuencias de inmunoglobulina; un conjunto, una colección, o una biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen un conjunto, una colección, o una biblioteca sintética o semi-sintética de secuencias de inmunoglobulina; y/o un conjunto, una colección, o una biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen un conjunto, una colección, o una biblioteca de secuencias de inmunoglobulina que se hayan sometido a maduración de afinidad.

También, en este método, el conjunto, la colección, o la biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos puede codificar un conjunto, una colección, o una biblioteca de dominios variables de cadena pesada (tales como dominios V_H o dominios V_{HH}) o de dominios variables de cadena ligera. Por ejemplo, el conjunto, la colección, o la biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos puede codificar un conjunto, una colección, o una biblioteca de los anticuerpos de dominio o de los anticuerpos de un solo dominio, o un conjunto, una colección, o una biblioteca de secuencias de aminoácidos que sean capaces de funcionar como un anticuerpo de dominio o como un anticuerpo de un solo dominio.

En un aspecto preferido de este método, el conjunto, la colección, o la biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos puede ser un conjunto, una colección, o una biblioteca inmunitaria de secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, derivadas a partir de un mamífero que se haya inmunizado adecuadamente con el CXCR2 o con un determinante antigenógeno adecuado basado en el mismo o derivado del mismo, tal como una parte, un fragmento, una región, un dominio, un ciclo, u otro epítopo antigenógeno del mismo. En un aspecto particular, el determinante antigenógeno puede ser una parte, región, dominio, o ciclo extracelular, u otros epítopos extracelulares.

En la generación de los polipéptidos de la presente invención, las llamas se inmunizaron con los antígenos como se explica anteriormente.

En los métodos anteriores, el conjunto, la colección, o la biblioteca de secuencias de nucleótidos se puede exhibir sobre un fago, fagémido, ribosoma o microorganismo adecuado (tal como levadura), tal como para facilitar el rastreo. Los métodos, técnicas, y organismos huésped adecuados para exhibir y rastrear (un conjunto, una colección, o una biblioteca de) secuencias de nucleótidos que codifiquen secuencias de aminoácidos quedarán claras para la persona experta en este campo, por ejemplo, con base en la divulgación adicional en la presente. También se hace referencia a la reseña por Hoogenboom en Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005).

En otro aspecto, el método para la generación de un polipéptido dirigido contra el CXCR2, el cual se puede utilizar en los polipéptidos biparatópicos de acuerdo con la invención, puede comprender al menos los pasos de:

- a) proporcionar un conjunto, una colección, o una biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen polipéptidos;
- b) rastrear el conjunto, la colección, o la biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos para encontrar las secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen una secuencia de aminoácidos que pueda enlazarse a, y/o que tenga afinidad por, el CXCR2 y que sea bloqueado cruzadamente o que bloquee cruzadamente un nanocuerpo biparatópico de la invención, por ejemplo, uno codificado por las SEQ ID NOs: 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47 o 61; y
- c) aislar la secuencia de ácido nucleico, seguido por expresar el polipéptido.

La invención también se refiere a los polipéptidos biparatópicos que se obtienen mediante los métodos anteriores, o de una manera alternativa, mediante un método que comprende uno de los métodos anteriores, y en adición al menos los pasos de determinar la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos de dicha secuencia de inmunoglobulina; y de expresar o sintetizar la secuencia de aminoácidos de una manera conocida por sí misma, tal como mediante la expresión en una célula huésped o en un organismo huésped adecuado o mediante la síntesis química y la construcción de un polipéptido biparatópico a partir de la misma.

El método anterior se puede llevar a cabo de cualquier manera adecuada, como quedará claro para la persona experta y como se discute con mayor detalle más adelante. Se hace referencia, por ejemplo, a la Patente Europea Número EP 0 542 810, a las Publicaciones Internacionales Números WO 05/19824, WO 04/051268 y WO 04/106377. Por ejemplo, el rastreo del paso b) de preferencia se lleva a cabo utilizando una técnica de citometría de flujo, tal como FACS. Para esto, se hace referencia, por ejemplo, a Lieby et al., Blood, Volumen 97, Número 12, 3820. Se hace una referencia particular a la denominada como la técnica "Nanoclone^{MR}" descrita en la Solicitud Internacional Número WO 06/079372 por Ablynx N.V.

Otra técnica para obtener las secuencias V_{HH} o las secuencias de nanocuerpos dirigidas contra el CXCR2, involucra inmunizar adecuadamente un mamífero transgénico que sea capaz de expresar los anticuerpos de cadena pesada

(es decir, de tal manera que se eleve una respuesta inmunitaria, y/o los anticuerpos de cadena pesada dirigidos contra el CXCR2, obtener una muestra biológica adecuada a partir del mamífero transgénico que contenga (secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen) las secuencias V_{HH} o las secuencias de nanocuerpos (tal como una muestra de sangre, una muestra de suero, o una muestra de células-B), y entonces generar las secuencias V_{HH}

5 dirigidas contra el CXCR2, empezando a partir de la muestra mencionada, utilizando cualquier técnica adecuada conocida por sí misma (tal como cualquiera de los métodos descritos en la presente o una técnica de hibridoma). Por ejemplo, para este propósito, se pueden utilizar ratones que expresen el anticuerpo de cadena pesada y los métodos y técnicas adicionales descritos en las Publicaciones Internacionales Números WO 02/085945, WO 04/049794 y WO
10 06/008548, y en Janssens et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 10 de Octubre de 2006; 103(41): 15130-5. Por ejemplo, los ratones que expresan el anticuerpo de cadena pesada pueden expresar los anticuerpos de cadena pesada con cualquier (único) dominio variable adecuado, tales como los (únicos) dominios variables a partir de las fuentes naturales (por ejemplo, los (únicos) dominios variables humanos, los (únicos) dominios variables de camélido, o los (únicos) dominios variables de tiburón, así como, por ejemplo, los (únicos) dominios variables sintéticos o semi-sintéticos.

15 Otros métodos y técnicas adecuadas para obtener los nanocuerpos para utilizarse en la invención y/o los ácidos nucleicos que codifiquen los mismos, empezando a partir de las secuencias V_H que se presentan naturalmente o de preferencia a partir de las secuencias V_{HH} , quedarán claras para la persona experta, y, por ejemplo, pueden incluir las técnicas que se mencionan en la página 64 de la Publicación Internacional Número WO 08/00279, como se menciona en la presente.

20 Los dominios V_{HH} o los nanocuerpos se pueden caracterizar por uno o más "Residuos Hallmark" dentro de sus regiones de estructura (FRs). Los residuos Hallmark son aquéllos residuos que caracterizan la región de estructura (FR) como a partir de un camélido, por ejemplo, una fuente de llama. De conformidad con lo anterior, los residuos Hallmark son un objetivo deseable para la sustitución, de preferencia una sustitución humanizante.

25 De acuerdo con la numeración de Kabat, los residuos Hallmark pueden estar en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 o 108 en un nanocuerpo. Los ejemplos no limitantes de (las combinaciones adecuadas de) estas secuencias de estructura y los residuos Hallmark alternativos se dan en las páginas 65 a 98 de la Publicación Internacional Número WO 2008/020079, cuyas páginas se incorporan a la presente en su totalidad. Otras secuencias humanizadas o parcialmente humanizadas conocidas en la materia también son contempladas y abarcadas dentro de la invención.

30 Como ya se discutió en la presente, un nanocuerpo para utilizarse en la invención puede tener al menos "una diferencia de aminoácido" (como se define en la presente) en al menos una de las regiones de estructura, comparándose con la región de estructura correspondiente de dominio V_H humano que se presente naturalmente, y en particular, comparándose con la región de estructura correspondiente del DP-47. De una manera más específica, de acuerdo con un aspecto no limitante de la invención, un nanocuerpo puede tener al menos "una diferencia de aminoácido" (como se define en la presente) en al menos uno de los residuos Hallmark (incluyendo aquéllos en las posiciones 108, 103 y/o 45), comparándose con la región de estructura correspondiente de un dominio V_H humano que se presente naturalmente, y en particular, comparándose con la región de estructura correspondiente del DP-47. Usualmente, un nanocuerpo tendrá al menos una diferencia de aminoácido con un dominio V_H que se presente naturalmente, en al menos una de la FR2 y/o FR4, y en particular, al menos uno de los residuos Hallmark en la FR2 y/o FR4 (nuevamente, incluyendo aquéllos en las posiciones 108, 103 y/o 45).

40 También, un nanocuerpo humanizado de la invención puede ser como se define en la presente, pero con la condición de que tenga al menos "una diferencia de aminoácido" (como se define en la presente) en al menos una de las regiones de estructura, comparándose con la región de estructura correspondiente de un dominio V_{HH} que se presente naturalmente. De una manera más específica, de acuerdo con un aspecto no limitante de la invención, un nanocuerpo humanizado o de secuencia de otra manera optimizada puede ser como se define en la presente, pero con la condición de que tenga al menos "una diferencia de aminoácido" (como se define en la presente) en al menos uno de los residuos Hallmark (incluyendo aquéllos en las posiciones 108, 103 y/o 45), comparándose con la región de estructura correspondiente de un dominio V_{HH} que se presente naturalmente. Usualmente, un nanocuerpo humanizado o de secuencia de otra manera optimizada tendrá al menos una diferencia de aminoácido con un dominio V_{HH} que se presente naturalmente en al menos una de la FR2 y/o FR4, y en particular, en al menos uno de los residuos Hallmark en la FR2 y/o FR4 (nuevamente, incluyendo aquéllos en las posiciones 108, 103 y/o 45).

45 Como quedará claro a partir de la divulgación de la presente, también está dentro del alcance de la invención utilizar análogos, mutantes, variantes, alelos, homólogos y ortólogos naturales o sintéticos (referidos colectivamente en la presente como "análogos") del único dominio variable de inmunoglobulina de la invención, como se define en la presente, y en particular, los análogos de los nanocuerpos biparatópicos de las SEQ ID NOs: 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47, 61, 53, 54, 46, 69, 68, 67 o 66.

50 En términos generales, en estos análogos, uno o más residuos de aminoácidos pueden haber sido reemplazados, suprimidos y/o agregados, comparándose con los únicos dominios variables de inmunoglobulina de la invención, como se define en la presente. Estas sustituciones, inserciones o supresiones se pueden hacer en una o más de las regiones de estructura y/o en una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs). Cuando

estas sustituciones, inserciones o supresiones se hacen en una o más de las regiones de estructura, se pueden hacer en uno o más de los residuos Hallmark y/o en una o más de las otras posiciones en los residuos de estructura, aunque en general son menos preferidas las sustituciones, inserciones o supresiones en los residuos Hallmark (a menos que éstas sean sustituciones humanizantes adecuadas, como se describen en la presente).

- 5 Por medio de los ejemplos no limitantes, una sustitución, por ejemplo, pueden ser una sustitución conservadora (como se describe en la presente) y/o un residuo de aminoácido puede ser reemplazado por otro residuo de aminoácido que se presente naturalmente en la misma posición en otro dominio V_{HH} (véase la Publicación Internacional Número WO 2008/020079 para algunos ejemplos no limitantes de estas sustituciones), aunque la invención en general no se limita a los mismos. Por consiguiente, cualquiera o más sustituciones, supresiones o inserciones, o cualquier combinación de las mismas, que mejore las propiedades de, por ejemplo, un nanocuerpo para utilizarse en un nanocuerpo biparatópico de la invención, o bien que al menos no perjudique demasiado las propiedades deseadas o el balance o la combinación de las propiedades deseadas de la invención (es decir, hasta el grado en que el nanocuerpo o el nanocuerpo biparatópico ya no sea adecuado para su uso pretendido) se incluyen dentro del alcance de la invención. Una persona experta en general podrá determinar y seleccionar las sustituciones, supresiones o inserciones adecuadas, o las combinaciones adecuadas de las mismas, basándose en la divulgación de la presente, y opcionalmente después de un grado limitado de experimentación de rutina, las cuales, por ejemplo, pueden involucrar la introducción de un número limitado de posibles sustituciones, y la determinación de su influencia sobre las propiedades de los nanocuerpos obtenidos de esta manera.
- 10 Por ejemplo, y dependiendo del organismo huésped utilizado para expresar el nanocuerpo biparatópico o el polipéptido de la invención, estas supresiones y/o sustituciones se pueden diseñar de tal manera que se remuevan uno o más sitios para la modificación posterior a la traducción (tales como uno o más sitios de glicosilación), como quedará dentro de la capacidad de la persona experta en este campo. De una manera alternativa, las sustituciones o inserciones se pueden diseñar de tal manera que se introduzcan uno o más sitios para la unión de los grupos funcionales (como se describen en la presente), por ejemplo, para permitir la pegilación específica del sitio (nuevamente como se describe en la presente).
- 15
- 20
- 25

En términos generales en la presente, el facilitar las sustituciones, inserciones o supresiones en la secuencia de aminoácidos para los propósitos de asegurar las propiedades o características estructurales particulares no presentes en la secuencia nativa, incluyendo las sustituciones "humanizantes", es referido como "optimización de secuencia". En este aspecto, se puede hacer referencia a la sección de definiciones en la presente, en el punto (y).

- 30 Los análogos son de preferencia de tal manera que pueden enlazarse al CXCR2 con una afinidad (adecuadamente medida y/o expresada como un valor K_D (real o aparente), un valor K_A (real o aparente), un índice $k_{activada}$ y/o un índice $k_{desactivada}$, o de una manera alternativa como un valor IC_{50} , como se describe adicionalmente en la presente) que es como se define en la presente para los nanocuerpos biparatópicos de la invención.

- 35 Los análogos son de preferencia también de tal manera que retienen las propiedades favorables de los nanocuerpos biparatópicos, como se describen en la presente.

También, de acuerdo con un aspecto preferido, los análogos tienen un grado de identidad de secuencia de al menos el 70 %, de preferencia de al menos el 80 %, más preferiblemente de al menos el 90 %, tal como de al menos el 95 % o el 99 % o más; y/o de preferencia tienen cuando mucho 20, de preferencia cuando mucho 10, todavía más preferiblemente cuando mucho 5, tal como 4, 3, 2 o solamente 1 diferencia de aminoácido (como se define en la presente), con uno de los nanocuerpos biparatópicos de las SEQ ID NOs: 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47, 61, 53, 54, 46, 69, 68, 67 o 66.

También, las secuencias de estructura y las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de los análogos son de preferencia de tal manera que están de acuerdo con los aspectos preferidos definidos en la presente. En términos más generales, como se describe en la presente, los análogos tendrán (a) una Q en la posición 108; y/o (b) un aminoácido cargado o un residuo de cisteína en la posición 45 y de preferencia una E en la posición 44, y de una manera muy preferible, E en la posición 44 y R en la posición 45; y/o (c) P, R o S en la posición 103.

Una clase preferida de análogos de los dominios biparatópicos V_{HH} o de los nanocuerpos de la invención, se han humanizado (es decir, comparándose con la secuencia de un nanocuerpo que se presente naturalmente). Como se menciona, esta humanización en términos generales involucra reemplazar uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de una V_{HH} que se presente naturalmente, con los residuos de aminoácidos que se presenten en la misma posición en un dominio V_H humano, tal como un dominio V_{H3} humano. Los ejemplos de las posibles sustituciones humanizantes diferentes de aquéllas que se dan específicamente a conocer en las Tablas 20, 22, 24, 26, 28 y 30 de la presente, aunque otras combinaciones de sustituciones humanizantes quedarán claras para la persona experta a partir de una comparación entre la secuencia de un nanocuerpo y la secuencia de un dominio V_H humano que se presente naturalmente, y a partir de la divulgación de la Publicación Internacional Número WO 2008/020079 como ya se dio a conocer en la presente.

En términos generales, como un resultado de la humanización, los únicos dominios variables de inmunoglobulina, en particular, los nanocuerpos de la invención, pueden llegar a ser más "de tipo humano", mientras que todavía

- conservan las propiedades favorables de los nanocuerpos de la invención, como se describen en la presente. Como un resultado, estos nanocuerpos humanizados pueden tener varias ventajas, tales como una inmunogenicidad reducida, comparándose con los dominios V_{HH} que se presentan naturalmente correspondientes. Nuevamente, basándose en la divulgación de la presente, y opcionalmente después de un grado limitado de experimentación de rutina, la persona experta podrá hacer las sustituciones humanizantes o las combinaciones adecuadas de sustituciones humanizantes que optimicen o logren un equilibrio deseado o adecuado entre las propiedades favorables proporcionadas por las sustituciones humanizantes por una parte, y las propiedades favorables de los dominios V_{HH} que se presentan naturalmente por otra parte.
- Los nanocuerpos para incorporarse en los nanocuerpos biparatópicos de la invención se pueden humanizar adecuadamente en cualesquiera residuos de estructura, tal como en uno o más residuos Hallmark (como se definen en la presente) o en uno o más residuos de estructura diferentes (es decir, no residuos Hallmark) o cualquier combinación adecuada de los mismos. Una sustitución humanizante preferida para los nanocuerpos del "grupo P,R,S-103" o del "grupo KERE" es Q108 en L108. Los nanocuerpos de la "clase GLEW" también se pueden humanizar mediante una sustitución de Q108 en L108, en el entendido de que al menos uno de los otros residuos Hallmark contenga una sustitución de camélido (camelizante) (como se define en la presente). Por ejemplo, como se menciona anteriormente, una clase particularmente preferida de nanocuerpos humanizados tiene GLEW o una secuencia tipo GLEW en las posiciones 44-47; P, R o S (y en particular, R) en la posición 103, y una L en la posición 108.
- Los análogos humanizados y otros análogos, y las secuencias de ácidos nucleicos que los codifican, se pueden proporcionar de cualquier manera conocida por sí misma, por ejemplo, utilizando una o más de las técnicas mencionadas en las páginas 103 y 104 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079.
- Como se menciona en las mismas, también quedará claro para la persona experta, que los únicos dominios variables de inmunoglobulina de la invención (incluyendo sus análogos) se pueden diseñar y/o preparar empezando a partir de las secuencias V_H humanas (es decir, las secuencias de aminoácidos o las secuencias de nucleótidos correspondientes), tal como, por ejemplo, a partir de las secuencias V_{H3} humanas, tales como DP-47, DP-51 o DP-29, es decir, mediante la introducción de una o más sustituciones camelizantes (es decir, cambiando uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del dominio V_H humano en los residuos de aminoácidos que se presenten en la posición correspondiente en un dominio V_{HH}), de tal manera que se proporcione la secuencia de un nanocuerpo de la invención y/o de tal manera que se confieran las propiedades favorables de un nanocuerpo a la secuencia obtenida de esta manera. Nuevamente, esto se puede llevar a cabo en general empleando los diferentes métodos y técnicas referidos en el párrafo anterior, utilizando una secuencia de aminoácidos y/o una secuencia de nucleótidos para un dominio V_H humano como un punto de partida.
- Algunas sustituciones camelizantes preferidas, pero limitantes, se pueden derivar a partir de la Publicación Internacional Número WO 2008/020079. También quedará claro que las sustituciones camelizantes en uno o más de los residuos Hallmark tendrán en general una mayor influencia sobre las propiedades deseadas que las sustituciones en una o más de las otras posiciones de aminoácidos, aunque ambas y cualquier combinación adecuada de las mismas se incluyen dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, es posible introducir una o más sustituciones camelizantes que ya confieran al menos algunas de las propiedades deseadas, y entonces introducir sustituciones camelizantes adicionales que mejoren adicionalmente esas propiedades y/o que confieran propiedades favorables adicionales. Nuevamente, la persona experta en general podrá determinar y seleccionar las sustituciones camelizantes adecuadas o las combinaciones adecuadas de sustituciones camelizantes, basándose en la divulgación de la presente, y opcionalmente después de un grado limitado de experimentación de rutina, la cual, por ejemplo, puede involucrar la introducción de un número limitado de posibles sustituciones camelizantes, y determinar si se obtienen o se mejoran las propiedades favorables de los únicos dominios variables de inmunoglobulina (es decir, comparándose con el dominio V_H original). En términos generales, sin embargo, estas sustituciones camelizantes son de preferencia tales que la secuencia de aminoácidos resultante al menos contiene (a) una Q en la posición 108; y/o (b) un aminoácido cargado o un residuo de cisteína en la posición 45, y de preferencia también una E en la posición 44, y de una manera muy preferible, E en la posición 44 y R en la posición 45; y/o (c) P, R o S en la posición 103; y opcionalmente una o más sustituciones camelizantes adicionales. Más preferiblemente, las sustituciones camelizantes son tales que dan como resultado un único dominio variable de inmunoglobulina para utilizarse en la invención y/o un análogo del mismo (como se define en la presente), tal como un análogo humanizado y/o de preferencia un análogo que es como se define en los párrafos anteriores.
- Los únicos dominios variables de inmunoglobulina, tales como los nanocuerpos, también se pueden derivar a partir de los dominios V_H mediante la incorporación de sustituciones que son raras en la naturaleza, pero no obstante, son estructuralmente compatibles con el pliegue del dominio V_H . Por ejemplo, pero sin ser limitantes, estas sustituciones pueden incluir uno o más de los siguientes: Gly en la posición 35, Ser, Val o Thr en la posición 37, Ser, Thr, Arg, Lys, His, Asp o Glu en la posición 39, Glu o His en la posición 45, Trp, Leu, Val, Ala, Thr, o Glu en la posición 47, S o R en la posición 50. (Barthelemy et al., J Biol Chem. 8 de Febrero de 2008; 283(6): 3639-54. Publicación Electrónica, 28 de Noviembre de 2007).
- La invención también comprende los derivados de los polipéptidos biparatópicos de la invención. Estos derivados se pueden obtener en general mediante la modificación, y en particular, mediante la modificación química y/o biológica

(por ejemplo, enzimática), de los polipéptidos biparatópicos de la invención y/o de uno o más de los residuos de aminoácidos que forman los polipéptidos biparatópicos de la invención.

Los ejemplos de estas modificaciones, así como los ejemplos de los residuos de aminoácidos dentro de la secuencia del polipéptido que se puede modificar de esta manera (es decir, ya sea sobre la estructura base de la proteína, pero de preferencia sobre una cadena lateral), los métodos y técnicas que se pueden utilizar para introducir estas modificaciones, y los usos potenciales y las ventajas de estas modificaciones, quedarán claros para la persona experta.

Por ejemplo, esta modificación puede involucrar la introducción (por ejemplo, mediante un enlace covalente o de otra manera adecuada) de uno o más grupos funcionales, residuos o fracciones en o sobre el polipéptido biparatópico de la invención, y en particular, de uno o más grupos funcionales, residuos o fracciones que confieran una o más propiedades o funcionalidades deseadas al polipéptido biparatópico de la invención. Los ejemplos de estos grupos funcionales quedarán claros para la persona experta.

Por ejemplo, esta modificación puede comprender la introducción (por ejemplo, mediante un enlace covalente o de cualquier otra manera adecuada) de uno o más grupos funcionales que aumenten la vida media, la solubilidad y/o la absorción del polipéptido de la invención, que reduzcan la inmunogenicidad y/o la toxicidad del polipéptido de la invención, que eliminen o atenúen cualesquier efectos secundarios indeseables del polipéptido de la invención, y/o que confieran otras propiedades convenientes y/o que reduzcan las propiedades indeseadas de los nanocuerpos biparatópicos y/o los polipéptidos de la invención; o cualquier combinación de dos o más de los anteriores. Los ejemplos de estos grupos funcionales y de las técnicas para introducirlos quedarán claros para la persona experta, y pueden comprender en general todos los grupos funcionales conocidos en la materia, así como los grupos funcionales y técnicas conocidas por sí mismas para la modificación de las proteínas farmacéuticas, y en particular, para la modificación de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (incluyendo los ScFvs y los anticuerpos de un solo dominio), para los cuales se hace referencia, por ejemplo, a Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a. Edición, Mack Publishing Co., Easton, PA (1980). Estos grupos funcionales, por ejemplo, se pueden enlazar directamente (por ejemplo, de una manera covalente) a un polipéptido biparatópico de la invención, u opcionalmente por medio de un enlazador o espaciador adecuado, como nuevamente estará claro para la persona experta.

Otra modificación usualmente menos preferida comprende la glicosilación N-enlazada u O-enlazada, usualmente como parte de la modificación en conjunto con la traducción y/o posterior a la traducción, dependiendo de la célula huésped utilizada para expresar el nanocuerpo biparatópico o el polipéptido de la invención.

Todavía otra modificación puede comprender la introducción de una o más marcas detectables u otros grupos o fracciones de generación de señales, dependiendo del uso pretendido del polipéptido o nanocuerpo marcado. Las marcas adecuadas y las técnicas para unirlas, utilizarlas y detectarlas quedarán claras para la persona experta y, por ejemplo, incluyen, pero no se limitan a, las marcas fluorescentes, las marcas fosforescentes, las marcas quimiluminiscentes, las marcas bioluminiscentes, radioisótopos, metales, quelatos de metales, cationes metálicos, cromóforos y enzimas, tales como aquéllos mencionados en la página 109 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079. Otras marcas adecuadas quedarán claras para la persona experta, y, por ejemplo, incluyen las fracciones que se pueden detectar utilizando RMN o espectroscopía ESR.

Los nanocuerpos biparatópicos y los polipéptidos marcados de la invención, por ejemplo, se pueden utilizar para los ensayos *in vitro*, *in vivo*, o *in situ* (incluyendo los inmunoensayos conocidos por sí mismos, tales como ELISA, RIA, EIA y otros "ensayos de emparedado", etc.), así como para propósitos de diagnóstico y de toma de imágenes *in vivo*, dependiendo de la elección de la marca específica.

Como quedará claro para la persona experta, otra modificación puede involucrar la introducción de un grupo quelante, por ejemplo, para quelar uno de los metales o cationes metálicos referidos anteriormente. Los grupos quelantes adecuados, por ejemplo, incluyen, sin limitación, ácido dietilen-triamina-penta-acético (DTPA) o ácido etilen-diamina-tetra-acético (EDTA).

Todavía otra modificación puede comprender la introducción de un grupo funcional que sea una parte de un par de enlace específico, tal como el par de enlace de biotina-(estrept)avidina. Este grupo funcional se puede utilizar para enlazar el polipéptido biparatópico o el nanocuerpo de la invención con otra proteína, polipéptido o compuesto químico que se enlace a la otra mitad del par de enlace, es decir, a través de la formación del par de enlace. Por ejemplo, un nanocuerpo biparatópico de la invención se puede conjugar con biotina, y se puede enlazar a otra proteína, polipéptido, compuesto o vehículo conjugado con avidina o estreptavidina. Por ejemplo, este nanocuerpo biparatópico conjugado se puede utilizar como un reportero, por ejemplo, en un sistema de diagnóstico en donde un agente productor de señal detectable se conjuga con avidina o estreptavidina. Estos pares de enlace, por ejemplo, también se pueden utilizar para enlazar el nanocuerpo biparatópico de la invención con un vehículo, incluyendo los vehículos adecuados para propósitos farmacéuticos. Un ejemplo no limitante es el de las formulaciones liposomales descritas por Cao y Suresh, Journal of Drug Targetting, 8, 4, 257 (2000). Estos pares de enlace también se pueden utilizar para enlazar un agente terapéuticamente activo al nanocuerpo de la invención.

Para algunas aplicaciones, en particular, para las aplicaciones en donde se pretenda aniquilar una célula que

exprese el objetivo de CXCR2 contra el cual se dirijan los polipéptidos biparatópicos o únicos dominios variables de inmunoglobulina de la invención (por ejemplo, en el tratamiento de cáncer), o para reducir o hacer más lento el crecimiento y/o la proliferación de esa célula, los polipéptidos biparatópicos de la invención también se pueden enlazar a una toxina, o a un residuo o una fracción tóxica. Los ejemplos de las fracciones, los compuestos, o los residuos tóxicos que se pueden enlazar a un polipéptido biparatópico de la invención para proporcionar – por ejemplo – un compuesto citotóxico, quedarán claros para la persona experta y, por ejemplo, se pueden encontrar en la técnica previa citada anteriormente y/o en la descripción adicional en la presente. Un ejemplo es la denominada como la tecnología ADEPT^{MR} descrita en la Publicación Internacional Número WO 03/055527.

Otras modificaciones químicas y enzimáticas potenciales quedarán claras para la persona experta. Estas modificaciones también se pueden introducir para propósitos de investigación (por ejemplo, para estudiar las relaciones de función-actividad). Se hace referencia, por ejemplo, a Lundblad y Bradshaw, Biotechnol. Appl. Biochem., 26, 143-151 (1997).

De preferencia, los derivados son tales que se enlanzan al CXCR2 con una afinidad (adecuadamente medida y/o expresada como un valor K_D (real o aparente), un valor K_A (real o aparente), un índice k_{activada} y/o un índice $k_{\text{desactivada}}$, o de una manera alternativa, como un valor IC_{50} , como se describe adicionalmente en la presente) que es como se define en la presente para los nanocuerpos biparatópicos de la invención.

Como se menciona anteriormente, la invención también se refiere a proteínas o polipéptidos que consisten esencialmente en, o que comprenden al menos un polipéptido biparatópico de la invención. "Esencialmente consisten en" significa que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la invención es exactamente igual que la secuencia de aminoácidos de un polipéptido biparatópico de la invención, o bien corresponde a la secuencia de aminoácidos de ese polipéptido de la invención, el cual tiene un número limitado de residuos de aminoácidos, tal como de 1 a 20 residuos de aminoácidos, por ejemplo, de 1 a 10 residuos de aminoácidos, y de preferencia de 1 a 6 residuos de aminoácidos, tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 residuos de aminoácidos, agregados en el extremo amino-terminal, en el extremo carboxi-terminal, o tanto en el extremo amino-terminal como en el extremo carboxi-terminal de la secuencia de aminoácidos del polipéptido biparatópico.

Estos residuos de aminoácidos pueden o no cambiar, alterar o influenciar de otra manera las propiedades (biológicas) del polipéptido, y pueden o no agregar funcionalidad adicional al mismo. Por ejemplo, estos residuos de aminoácidos:

- pueden comprender un residuo Met N-terminal, por ejemplo, como un resultado de la expresión en una célula huésped u organismo huésped heterólogo.

- pueden formar una secuencia de señal o una secuencia líder que dirija la secreción del polipéptido biparatópico a partir de una célula huésped después de la síntesis. Los péptidos líder secretores adecuados quedarán claros para la persona experta, y pueden ser como se describen adicionalmente en la presente. Usualmente, la secuencia líder se enlazará al término-N del polipéptido biparatópico;

- pueden formar una secuencia o una señal que permite que el polipéptido biparatópico se dirija hacia y/o que penetre o entre en órganos, tejidos, células, o partes o compartimentos específicos de las células, y/o que permite que el polipéptido biparatópico penetre o cruce una barrera biológica, tal como una membrana celular, una capa celular, tal como una capa de células epiteliales, un tumor, incluyendo tumores sólidos, o la barrera hematoencefálica. Los ejemplos de estas secuencias de aminoácidos quedarán claros para la persona experta, e incluyen aquéllos mencionados en el párrafo c) de la página 112 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079.

- pueden formar una "marca", por ejemplo, una secuencia de aminoácidos o un residuo que permite o facilita la purificación del nanocuerpo biparatópico, por ejemplo, empleando las técnicas de afinidad dirigidas contra la secuencia o el residuo. Posteriormente, se puede remover la secuencia o el residuo (por ejemplo, mediante disociación química o enzimática), para proporcionar la secuencia del polipéptido biparatópico (para este propósito, la marca se puede enlazar opcionalmente a la secuencia del polipéptido biparatópico por medio de una secuencia enlazadora disociable, o puede contener un motivo disociable). Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, de estos residuos son múltiples residuos de histidina, residuos de glutationa y una marca myc (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 31 de la Publicación Internacional Número WO 06/12282).

- pueden ser uno o más residuos de aminoácidos que se han funcionalizado y/o que pueden servir como un sitio para la unión de grupos funcionales. Los residuos de aminoácidos y grupos funcionales adecuados quedarán claros para la persona experta e incluyen, pero no se limitan a, los residuos de aminoácidos y grupos funcionales mencionados en la presente para los derivados de los polipéptidos biparatópicos o nanocuerpos de la invención.

De acuerdo con otro aspecto, un polipéptido biparatópico de la invención comprende un nanocuerpo biparatópico de la invención que se fusiona en su extremo amino-terminal, en su extremo carboxi-terminal, o tanto en su extremo amino-terminal como en su extremo carboxi-terminal, con al menos un péptido o polipéptido adicional, es decir, de tal manera que se proporcione una proteína de fusión que comprende el nanocuerpo biparatópico de la invención y el uno o más péptidos o polipéptidos adicionales. Esta fusión también será referida en la presente como una "fusión

de nanocuerpo".

De preferencia, el péptido o polipéptido adicional es tal que confiere una o más propiedades o funcionalidades deseadas al nanocuerpo biparatópico o al polipéptido de la invención.

Por ejemplo, el péptido o polipéptido adicional también puede proporcionar un sitio de enlace adicional, cuyo sitio de enlace se puede dirigir contra cualquier proteína, polipéptido, antígeno, determinante antigénico, o epítopo deseado (incluyendo, pero no limitándose a, la misma proteína, polipéptido, antígeno, determinante antigénico, o epítopo contra el cual se dirija el polipéptido biparatópico de la invención, o una proteína, polipéptido, antígeno, determinante antigénico, o epítopo diferente).

Los ejemplos de estos péptidos o polipéptidos quedarán claros para la persona experta, y pueden comprender en general todas las secuencias de aminoácidos que se utilizan en las fusiones de péptidos basándose en los anticuerpos convencionales y fragmentos de los mismos (incluyendo, pero no limitándose a, ScFvs y los anticuerpos de un solo dominio). Se hace referencia, por ejemplo, a la reseña por Holliger y Hudson, *Nature Biotechnology*, 23, 9, 1126-1136 (2005).

Por ejemplo, este péptido o polipéptido puede ser una secuencia de aminoácidos que aumente la vida media, la solubilidad, o la absorción, reduce la inmunogenicidad o la toxicidad, elimina o atenúa los efectos secundarios indeseables, y/o confiere otras propiedades convenientes a, y/o reduce las propiedades indeseadas de, los polipéptidos de la invención, comparándose con el polipéptido de la invención por sí mismo. Algunos ejemplos no limitantes de estos péptidos y polipéptidos son las proteínas de suero, tales como la albúmina de suero humano (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 00/27435) o las moléculas hapténicas (por ejemplo, los haptenos que son reconocidos por los anticuerpos circulantes, véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 98/22141).

En particular, se ha descrito en la materia que los fragmentos de enlace de las inmunoglobulinas (tales como los dominios V_H) a la albúmina de suero o a los fragmentos de la misma, se pueden utilizar para aumentar la vida media. Se hace referencia a las Publicaciones Internacionales Números WO 00/27435 y WO 01/077137. De acuerdo con la invención, los polipéptidos biparatópicos, de preferencia el nanocuerpo biparatópico de la invención de preferencia se enlaza directamente a la albúmina de suero (o a un fragmento adecuado de la misma), o bien por medio de un enlazador adecuado, y en particular, por medio de un péptido adecuado enlazado de tal manera que el polipéptido de la invención se puede expresar como una fusión genética (proteína). De acuerdo con un aspecto específico, el nanocuerpo biparatópico de la invención se puede enlazar a un fragmento de albúmina de suero que al menos comprende el dominio III de la albúmina de suero o parte del mismo. Se hace referencia, por ejemplo, a la Publicación Internacional Número WO 07/112940 de Ablynx N.V.

De una manera alternativa, como ya se discutió en la presente, el péptido o polipéptido adicional puede proporcionar un sitio de enlace o unidad de enlace adicional que se dirige contra una proteína de suero (tal como, por ejemplo, albúmina de suero humano o otra proteína de suero, tal como IgG), de tal manera que se proporciona un aumento en la vida media en suero. Estas secuencias de aminoácidos, por ejemplo, incluyen los nanocuerpos descritos más adelante, así como los péptidos pequeños y proteínas de enlace descritas en las Publicaciones Internacionales Números WO 91/01743, WO 01/45746 y WO 02/076489, y los dAbs descritos en las Publicaciones Internacionales Números WO 03/002609 y WO 04/003019. También se hace referencia a Harmsen et al., *Vaccina*, 23 (41); 4926-42, 2005, así como a la Patente Europea Número EP 0 368 684, así como a las Publicaciones Internacionales Números WO 08/028977, WO 08/043821, y WO 08/043822 por Ablynx N.V., y la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica de Ablynx N.V. titulada como "*Peptides capable of binding to serum proteins*" presentada el 5 de Diciembre de 2006 ((véase también la Publicación Internacional Número WO 2008/068280). Estos péptidos o polipéptidos se pueden dirigir en particular contra la albúmina de suero (y más particularmente, la albúmina de suero humano) y/o contra la IgG (y más particularmente, la IgG humana). Por ejemplo, estas secuencias de aminoácidos pueden ser secuencias de aminoácidos que se dirijan contra la albúmina de suero (humano), y secuencias de aminoácidos que puedan enlazarse a los residuos de aminoácidos sobre la albúmina de suero (humano) que no estén involucradas en el enlace de la albúmina de suero al FcRn (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 06/0122787), y/o secuencias de aminoácidos que sean capaces de enlazarse a los residuos de aminoácidos sobre la albúmina de suero que no formen parte del dominio III de la albúmina de suero (véase nuevamente por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 06/0122787); secuencias de aminoácidos que tengan o puedan proporcionar un aumento en su vida media (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 08/028977 por Ablynx N.V.); secuencias de aminoácidos contra la albúmina de suero humano que reaccionen cruzadamente con la albúmina de suero a partir de al menos una especie de mamífero, y en particular, con al menos una especie de primate (tal como, sin limitación, monos del género *Macaca* (tales como, y en particular, monos cinomolgos (*Macaca fascicularis*) y/o monos rhesus (*Macaca mulatta*)), y babuinos (*Papio ursinus*), se hace nuevamente referencia a la Publicación Internacional Número WO 08/028977; secuencias de aminoácidos que puedan enlazarse a la albúmina de suero de una manera independiente del pH (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 08/043821 por Ablynx N.V. titulada como "*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*", y/o secuencias de aminoácidos que sean enlazadoras condicionales (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 08/043822 por Ablynx N.V. titulada como "*Amino acid sequences that bind to*

a desired molecule in a conditional manner").

De acuerdo con otro aspecto, el uno o más péptidos, polipéptidos o secuencias de proteínas adicionales pueden comprender una o más partes, fragmentos o dominios de los anticuerpos de cuatro cadenas convencionales (y en particular, de los anticuerpos humanos) y/o de los anticuerpos de cadena pesada. Por ejemplo, aunque usualmente es menos preferido, un nanocuerpo biparatópico de la invención se puede enlazar a un dominio V_H o V_L convencional (de preferencia humano) o a un análogo natural o sintético de un dominio V_H o V_L , de nuevo opcionalmente por medio de una secuencia enlazadora (incluyendo, pero no limitándose a, otros anticuerpos de (un solo) dominio, tales como los dAbs descritos por Ward et al.).

El polipéptido biparatópico o el nanocuerpo también se puede enlazar a uno o más dominios C_{H1} , C_{H2} y/o C_{H3} (de preferencia humanos), opcionalmente por medio de una secuencia enlazadora. Por ejemplo, se podría utilizar un nanocuerpo biparatópico enlazado a un dominio C_{H1} adecuado, por ejemplo - junto con cadenas ligeras adecuadas - para generar fragmentos de anticuerpos/estructuras análogas a los fragmentos Fab o a los fragmentos $F(ab')_2$ convencionales, pero en donde uno o (en el caso de un fragmento $F(ab')_2$) uno o ambos de los dominios V_H convencionales han sido reemplazados por un nanocuerpo biparatópico de la invención. También, dos polipéptidos biparatópicos se podrían enlazar a un dominio C_{H3} (opcionalmente por medio de un enlazador), para proporcionar una construcción con un aumento en la vida media *in vivo*.

De acuerdo con un aspecto específico de un polipéptido de la invención, uno o más polipéptidos biparatópicos o nanocuerpos de la invención se pueden enlazar (opcionalmente por medio de un enlazador adecuado o una región de articulación) a uno o más dominios constantes (por ejemplo, 2 o 3 dominios constantes que se pueden utilizar como parte de/para formar, una porción Fc) a una porción Fc y/o a una o más partes, fragmentos o dominios de anticuerpos que confieran una o más funciones efectoras al polipéptido de la invención y/o que puedan conferir la capacidad para enlazarse a uno o más receptores de Fc. Por ejemplo, para este propósito, y sin limitarse a lo mismo, el uno o más péptidos o polipéptidos adicionales pueden comprender uno o más dominios C_{H2} y/o C_{H3} de un anticuerpo, tal como a partir de un anticuerpo de cadena pesada (como se describe en la presente), y de una manera muy preferible, a partir de un anticuerpo de cuatro cadenas humano convencional; y/o pueden formar (parte de), una región Fc, por ejemplo, a partir de IgG (por ejemplo, a partir de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), a partir de IgE, o a partir de otra Ig humana, tal como IgA, IgD o IgM. Por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 94/04678 describe anticuerpos de cadena pesada que comprenden un dominio V_{HH} de camélido o un derivado humanizado del mismo (es decir, un nanocuerpo), en donde los dominios C_{H2} y/o C_{H3} de camélido han sido reemplazados por los dominios C_{H2} y C_{H3} humanos, de tal manera que se proporciona una inmunoglobulina que consiste en 2 cadenas pesadas, cada una de las cuales comprende un nanocuerpo y los dominios C_{H2} y C_{H3} humanos (pero no el dominio C_{H1}), cuya inmunoglobulina tiene la función efectora proporcionada por los dominios C_{H2} y C_{H3} , y cuya inmunoglobulina puede funcionar sin la presencia de cadenas ligeras. Otras secuencias de aminoácidos que se pueden enlazar adecuadamente a los nanocuerpos de la invención, de tal manera que se proporcione una función efectora, quedarán claras para la persona experta, y se pueden seleccionar con base en las funciones efectoras deseadas. Se hace referencia, por ejemplo, a las Publicaciones Internacionales Números WO 04/058820, WO 99/42077, WO 02/056910 y WO 05/017148, así como a la reseña por Holliger y Hudson, *supra*. El acoplamiento de un polipéptido, por ejemplo, de un nanocuerpo de la invención, a una porción Fc, también puede conducir a un aumento en su vida media, comparándose con el polipéptido correspondiente de la invención. Para algunas aplicaciones, el uso de una porción Fc y/o de los dominios constantes (es decir, los dominios C_{H2} y/o C_{H3}) que confieran aumento en la vida media sin ninguna función efectora biológicamente significativa también puede ser adecuado o incluso preferido. Otras construcciones adecuadas que comprendan uno o más polipéptidos biparatópicos, tales como los nanocuerpos, y uno o más dominios constantes con un aumento en la vida media *in vivo*, quedarán claras para la persona experta, y, por ejemplo, pueden comprender dos nanocuerpos enlazados a un dominio C_{H3} , opcionalmente por medio de una secuencia enlazadora. En términos generales, cualquier proteína de fusión, o sus derivados con un aumento en la vida media, de preferencia tendrán un peso molecular de más de 50 kD, el valor del corte para la absorción renal.

En otro aspecto específico, pero no limitante, con el objeto de formar un polipéptido de la invención, una o más secuencias de aminoácidos de la invención se pueden enlazar (opcionalmente por medio de un enlazador adecuado o de una región de articulación) a los dominios constantes que se presenten naturalmente, sintéticos, o semi-sintéticos (o a los análogos, variantes, mutantes, partes o fragmentos de los mismos) que tengan una tendencia reducida (o esencialmente ninguna tendencia) a auto-asociarse en dímeros (es decir, comparándose con los dominios constantes que se presentan naturalmente en los anticuerpos de cuatro cadenas convencionales). Estas variantes de cadena de Fc monoméricas (es decir, no auto-asociantes), o fragmentos de las mismas, quedarán claras para la persona experta. Por ejemplo, Helm et al., J Biol Chem 1996 271 7494, describe las variantes de cadena de Fc monoméricas que se pueden utilizar en las cadenas de los polipéptidos de la invención.

También, estas variantes de cadena de Fc monoméricas son de preferencia tales que todavía son capaces de enlazarse al complemento o a los receptores de Fc relevantes (dependiendo de la porción Fc a partir de la cual se deriven), y/o de tal manera que todavía tengan algunas o todas las funciones efectoras de la porción Fc a partir de la cual se deriven (o a un nivel reducido todavía adecuadas para el uso pretendido). De una manera alternativa, en esta cadena de polipéptido de la invención, la cadena de Fc monomérica se puede utilizar para conferir un aumento en la vida media a la cadena del polipéptido, en cuyo caso, la cadena de Fc monomérica también puede no tener, o

esencialmente no tener, funciones efectoras.

Los péptidos o polipéptidos adicionales también pueden formar una secuencia de señal o una secuencia líder que dirija la secreción del nanocuerpo biparatópico o el polipéptido de la invención a partir de una célula huésped después de la síntesis (por ejemplo, para proporcionar una pre-, pro- o prepro-forma del polipéptido de la invención, dependiendo de la célula huésped utilizada para expresar el polipéptido de la invención).

El péptido o polipéptido adicional también puede formar una secuencia o una señal que permita que el nanocuerpo biparatópico o el polipéptido de la invención sea dirigido hacia, y/o penetre o entre en, los órganos, tejidos, células, o partes o compartimientos específicos de las células, y/o que permita que el nanocuerpo biparatópico o el polipéptido de la invención penetre o cruce una barrera biológica, tal como una membrana celular, una capa celular, tal como una capa de células epiteliales, un tumor, incluyendo tumores sólidos, o la barrera hematoencefálica. Los ejemplos adecuados de estas secuencias de aminoácidos quedarán claros para la persona experta, y, por ejemplo, incluyen, pero no se limitan a, aquéllos mencionados en la página 118 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079. Para algunas aplicaciones, en particular, para las aplicaciones en donde se pretenda aniquilar una célula que exprese el objetivo contra el cual se dirijan los polipéptidos biparatópicos de la invención (por ejemplo, en el tratamiento de cáncer), o para reducir o hacer más lento el crecimiento y/o la proliferación de esta célula, los polipéptidos biparatópicos de la invención también se pueden enlazar a una proteína o un polipéptido (cito)tóxico. Los ejemplos de estas proteínas y polipéptidos tóxicos, los cuales se pueden enlazar a un nanocuerpo de la invención para proporcionar – por ejemplo – un polipéptido citotóxico de la invención, quedarán claros para la persona experta, y se pueden encontrar, por ejemplo, en la técnica previa citada anteriormente y/o en la descripción adicional en la presente. Un ejemplo es la denominada como tecnología ADEPT^{MR} descrita en la Publicación Internacional Número WO 03/055527.

De acuerdo con un aspecto opcional, pero no limitante, los uno o más péptidos o polipéptidos adicionales comprenden al menos un nanocuerpo adicional, de tal manera que se proporciona un polipéptido de la invención que comprende al menos tres, tal como cuatro, cinco o más nanocuerpos, en donde estos nanocuerpos se pueden enlazar opcionalmente por medio de una o más secuencias enlazadoras (como se definen en la presente).

Finalmente, también está dentro del alcance de la invención que los polipéptidos biparatópicos de la invención pueden contener dos o más nanocuerpos y uno o más péptidos o polipéptidos adicionales (como se menciona en la presente).

Para los polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen dos o más los dominios V_{HH} y su preparación, también se hace referencia a Conrath et al., J. Biol. Chem., Volumen 276, 10. 7346-7350, 2001; Muyldermans, Reviews in Molecular Biotechnology 74 (2001), 277-302; así como, por ejemplo, a las Publicaciones Internacionales Números WO 96/34103 y WO 99/23221. Algunos otros ejemplos de algunos polipéptidos multiespecíficos y/o multivalentes específicos de la invención se pueden encontrar en las solicitudes por Ablynx N.V. referidas en la presente.

Un ejemplo preferido de un polipéptido multiespecífico de la invención comprende al menos un nanocuerpo biparatópico de la invención, y al menos un nanocuerpo que proporcione un aumento en su vida media. Estos nanocuerpos, por ejemplo, pueden ser nanocuerpos que se dirijan contra una proteína de suero, y en particular, una proteína de suero humano, tal como albúmina de suero humano, proteína de enlace de tiroxina, transferrina (humana), fibrinógeno, una inmunoglobulina, tal como IgG, IgE o IgM, o contra una de las proteínas de suero enlistadas en la Publicación Internacional Número WO 04/003019. De éstos, los nanocuerpos que pueden enlazarse a la albúmina de suero (y en particular, a la albúmina de suero humano) o a la IgG (y en particular, a la IgG humana, véase, por ejemplo, el nanocuerpo VH-1 descrito en la reseña por Muyldermans, *supra*) son particularmente preferidos (aunque, por ejemplo, para los experimentos en los ratones o en los primates, se pueden utilizar los nanocuerpos contra o que reaccionen cruzadamente con la albúmina de suero de ratón (MSA) o con la albúmina de suero a partir de ese primate, respectivamente. Sin embargo, para uso farmacéutico, usualmente se preferirán los nanocuerpos contra la albúmina de suero humano o contra la IgG humana). Los nanocuerpos que proporcionan un aumento en la vida media, y que se pueden utilizar en los polipéptidos de la invención, incluyen los nanocuerpos dirigidos contra la albúmina de suero que se describen en las Publicaciones Internacionales Números WO 04/041865 y WO 06/122787, y en las solicitudes de patente adicionales por Ablynx N.V., tales como aquéllas mencionadas anteriormente.

Por ejemplo, algunos nanocuerpos preferidos que proporcionan un aumento en la vida media para utilizarse en la presente invención incluyen los nanocuerpos que pueden enlazarse a los residuos de aminoácidos sobre la albúmina de suero (humano) que no están involucrados en el enlace de la albúmina de suero al FcRn (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 06/0122787); los nanocuerpos que son capaces de enlazarse a los residuos de aminoácidos sobre la albúmina de suero que no forman parte del dominio III de la albúmina de suero (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 06/0122787); los nanocuerpos que tienen o pueden proporcionar un aumento en su vida media (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 08/028977 por Ablynx N.V. mencionada en la presente); los nanocuerpos contra la albúmina de suero humano que reaccionan cruzadamente con la albúmina de suero a partir de al menos una especie de mamífero, y en particular, con al menos una especie de primate (tal como, sin limitación, monos del género *Macaca* (tales como, y en particular, monos

cinomolgos (*Macaca fascicularis*) y/o monos rhesus (*Macaca mulatta*)), y babuinos (*Papio ursinus*)) (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 08/028977 por Ablynx N.V.); los nanocuerpos que pueden enlazarse a la albúmina de suero de una manera independiente del pH (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 2008/043821 por Ablynx N.V. mencionada en la presente), y/o los nanocuerpos que son enlazadores condicionales (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 08/043822 por Ablynx N.V.).

Algunos nanocuerpos particularmente preferidos que proporcionan un aumento en la vida media, y que se pueden utilizar en los polipéptidos de la invención, incluyen los nanocuerpos ALB-1 a ALB-10 que se dan a conocer en la Publicación Internacional Número WO 06/122787 (véanse las Tablas II y III), de los cuales, se prefiere en particular el ALB-8 (SEQ ID NO: 62 en la Publicación Internacional Número WO 06/122787).

De acuerdo con un aspecto específico de la invención, los polipéptidos de la invención contienen, además de los dos o más nanocuerpos, al menos un nanocuerpo contra la albúmina de suero humano.

Otros péptidos o polipéptidos adicionales que se pueden agregar o unir o fusionar con los polipéptidos biparatópicos de la invención incluyen un polímero compuesto de Prolina, Alanina y Serina (una secuencia PAS). Las secuencias PAS pueden estar comprendidas de 200 a 600 residuos, y conducen a un volumen hidrodinámico dramáticamente incrementado que da como resultado la prolongación de la vida media en plasma. La vida media en suero de los polipéptidos biparatópicos de la invención también se puede prolongar mediante la fusión a un polipéptido de 864 aminoácidos denominado como XTEN, como se describe en Schellenberger et al. (2009), *Nature Biotechnology* 27, Número 12, páginas 1186-1190.

En términos generales, cualesquiera polipéptidos de la invención con un aumento en la vida media que contienen uno o más nanocuerpos biparatópicos de la invención, y cualesquiera derivados de los nanocuerpos biparatópicos de la invención, o de los polipéptidos que tienen un aumento en su vida media, de preferencia tienen una vida media que es al menos 1.5 veces, de preferencia al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo, al menos 10 veces o más de 20 veces, mayor que la vida media del nanocuerpo correspondiente de la invención por sí mismo.

Por ejemplo, estos derivados o polipéptidos con un aumento en la vida media, pueden tener una vida media que aumente con más de 1 hora, de preferencia más de 2 horas, más preferiblemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 o 72 horas, comparándose con el nanocuerpo correspondiente de la invención por sí mismo.

En un aspecto preferido, pero no limitante, de la invención, estos derivados o polipéptidos pueden exhibir una vida media en suero en el ser humano, de al menos aproximadamente 12 horas, de preferencia de al menos 24 horas, más preferiblemente de al menos 48 horas, todavía más preferiblemente de al menos 72 horas o más. Por ejemplo, estos derivados o polipéptidos pueden tener una vida media de al menos 5 días (tal como de aproximadamente 5 a 10 días), de preferencia de al menos 9 días (tal como de aproximadamente 9 a 14 días), más preferiblemente de al menos aproximadamente 10 días (tal como de aproximadamente 10 a 15 días), o de al menos aproximadamente 11 días (tal como de aproximadamente 11 a 16 días), más preferiblemente de al menos aproximadamente 12 días (tal como de aproximadamente 12 a 18 días o más), o más de 14 días (tal como de aproximadamente 14 a 19 días).

Otro ejemplo preferido, pero no limitante, de un polipéptido multiespecífico de la invención, comprende al menos un nanocuerpo biparatópico de la invención, y al menos un nanocuerpo que dirige el polipéptido de la invención hacia, y/o que permite que el polipéptido de la invención penetre o entre en los órganos, tejidos, células, o partes o compartimientos específicos de las células, y/o que permite que el nanocuerpo penetre o cruce una barrera biológica, tal como una membrana celular, una capa celular, tal como una capa de células epiteliales, un tumor, incluyendo tumores sólidos, o la barrera hematoencefálica. Los ejemplos de estos nanocuerpos incluyen los nanocuerpos que se dirigen hacia las proteínas de superficie celular, marcadores o epitopos específicos del órgano, tejido o célula deseados (por ejemplo, los marcadores de superficie celular asociados con las células tumorales), y los fragmentos de anticuerpos de un solo dominio que se dirigen al cerebro descritos en las Publicaciones Internacionales Números WO 02/057445 y WO 06/040153, de los cuales, los ejemplos preferidos son el FC44 (SEQ ID NO: 189 de la Publicación Internacional Número WO 06/040153), y el FC5 (SEQ ID NO: 190 de la Publicación Internacional Número WO 06/040154).

En los polipéptidos de la invención, los dos o más nanocuerpos y los uno o más polipéptidos se pueden enlazar directamente unos a otros (como se describe, por ejemplo, en la Publicación Internacional Número WO 99/23221), y/o se pueden enlazar unos a otros por medio de uno o más espaciadores o enlazadores adecuados, o cualquier combinación de los mismos.

De acuerdo con un aspecto de la invención, el polipéptido de la invención está en una forma esencialmente aislada, como se define en la presente.

Las secuencias de aminoácidos, los nanocuerpos biparatópicos, polipéptidos y ácidos nucleicos de la invención se pueden preparar de una manera conocida por sí misma, como quedará claro para la persona experta a partir de la descripción adicional en la presente. Por ejemplo, los nanocuerpos biparatópicos y los polipéptidos de la invención se pueden preparar de cualquier manera conocida por sí misma para la preparación de anticuerpos y, en particular,

para la preparación de fragmentos de anticuerpos (incluyendo, pero no limitándose a, anticuerpos de (un solo) dominio y fragmentos ScFv). Algunos métodos preferidos, pero no limitantes, para la preparación de las secuencias de aminoácidos, los nanocuerpos, polipéptidos y ácidos nucleicos, incluyen los métodos y las técnicas descritas en la presente.

- 5 Como quedará claro para la persona experta, un método particularmente útil para la preparación de un nanocuerpo biparatópico y/o de un polipéptido de la invención, comprende, en términos generales, los pasos de:
- i) la expresión, en una célula huésped o en un organismo huésped adecuado (también referido en la presente como en el “huésped de la invención”), o en otro sistema de expresión adecuado, de un ácido nucleico que codifique el nanocuerpo biparatópico o el polipéptido de la invención (también referido en la presente como un “ácido nucleico de la invención”), opcionalmente seguido por:
- 10 ii) aislar y/o purificar el nanocuerpo biparatópico o el polipéptido de la invención obtenido de esta manera.

En particular, este método puede comprender los pasos de:

- i) cultivar y/o mantener un huésped de la invención bajo condiciones que sean tales que el huésped de la invención exprese y/o produzca al menos un nanocuerpo biparatópico y/o polipéptido de la invención, opcionalmente seguido por:
- 15 ii) aislar y/o purificar el nanocuerpo biparatópico o el polipéptido de la invención obtenido de esta manera.

En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención (o un fragmento adecuado del mismo). Este ácido nucleico también será referido en la presente como un “ácido nucleico de la invención” y, por ejemplo, puede estar en la forma de una construcción genética, como se describe adicionalmente en la presente.

20 En las realizaciones preferidas, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo de secuencias de aminoácidos estipuladas en las SEQ ID NOs: 25 a 43, 90 y SEQ ID NOs: 213 a 219 en relación con los nanocuerpos individuales específicos de las Tablas 9 y 32. De una manera alternativa, las moléculas de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención comprenden moléculas de ácidos nucleicos que codifican las construcciones de nanocuerpos multivalentes y biparatópicos de las SEQ ID NOs: 44 a 69. Además, las moléculas de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención comprenden moléculas con las secuencias de ácidos nucleicos de las SEQ ID NOs: 192 a 211 en relación con los nanocuerpos identificados en la Tabla 18.

25 Un ácido nucleico de la invención puede estar en la forma de ADN o ARN de una sola cadena o de doble cadena, y está de preferencia en la forma de ADN de doble cadena. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de la invención pueden ser ADN genómico, ADNc, o ADN sintético (tal como ADN con un uso de codones que se ha adaptado específicamente para la expresión en la célula huésped o el organismo huésped pretendido).

30 De acuerdo con un aspecto de la invención, el ácido nucleico de la invención está en una forma esencialmente aislada, como se define en la presente.

35 El ácido nucleico de la invención también puede estar en la forma de, puede estar presente en, y/o puede ser parte de, un vector, tal como, por ejemplo, un plásmido, cósmido, o YAC, el cual nuevamente puede estar en una forma esencialmente aislada.

40 Los ácidos nucleicos de la invención se pueden preparar u obtener de una manera conocida por sí misma, basándose en la información sobre las secuencias de aminoácidos para los polipéptidos de la invención dada en la presente, y/o se pueden aislar a partir de una fuente natural adecuada. Para proporcionar análogos, las secuencias de nucleótidos que codifiquen los dominios V_{HH} que se presentan naturalmente, por ejemplo, se pueden someter a mutagénesis dirigida al sitio, como para proporcionar un ácido nucleico de la invención que codifique dicho análogo. También, como quedará claro para la persona experta, con el fin de preparar un ácido nucleico de la invención, también se pueden enlazar entre sí varias secuencias de nucleótidos, tal como al menos una secuencia de nucleótidos que codifique un polipéptido de la invención y, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifiquen uno o más enlazadores, de una manera adecuada.

45 Las técnicas para la generación de los ácidos nucleicos de la invención quedarán claras para la persona experta y, por ejemplo, pueden incluir, pero no se limitan a, síntesis de ADN automatizada; mutagénesis dirigida al sitio; la combinación de dos o más secuencias que se presenten naturalmente y/o sintéticas (o dos o más partes de las mismas), la introducción de mutaciones que conduzcan a la expresión de un producto de expresión truncado; la introducción de uno o más sitios de restricción (por ejemplo, para crear casetes y/o regiones que se puedan digerir y/o ligar fácilmente utilizando las enzimas de restricción adecuadas), y/o la introducción de mutaciones por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando uno o más cebadores “mal emparejados”, utilizando, por ejemplo, una secuencia de una forma que se presente naturalmente del CXCR2 como una plantilla. Estas y otras técnicas quedarán claras para la persona experta, y nuevamente se hace referencia a los libros de texto

convencionales, tales como Sambrook et al., y Ausubel et al., mencionados anteriormente, así como a los Ejemplos que se encuentran más adelante.

El ácido nucleico de la invención también puede estar en la forma de, puede estar presente en, y/o puede ser parte de, una construcción genética. Estas construcciones genéticas comprenden en general al menos un ácido nucleico de la invención que opcionalmente se enlaza a uno o más elementos de las construcciones genéticas conocidos por sí mismos, tales como, por ejemplo, uno o más elementos reguladores adecuados (tales como promotores, potenciadores, terminadores adecuados, etc.), y los elementos adicionales de las construcciones genéticas referidos en la presente. Estas construcciones genéticas que comprenden al menos un ácido nucleico de la invención, también serán referidas en la presente como las "construcciones genéticas de la invención".

Las construcciones genéticas de la invención pueden ser ADN o ARN, y son de preferencia ADN de doble cadena. Las construcciones genéticas de la invención también pueden estar en una forma adecuada para la transformación de la célula huésped o del organismo huésped pretendido, en una forma adecuada para su integración en el ADN genómico de la célula huésped pretendida, o en una forma adecuada para la réplica independiente, el mantenimiento, y/o la herencia en el organismo huésped pretendido. Por ejemplo, las construcciones genéticas de la invención pueden estar en la forma de un vector, tal como, por ejemplo, un plásmido, cósmido, YAC, un vector viral, o un transposón. En particular, el vector puede ser un vector de expresión, es decir, un vector que pueda proporcionar la expresión *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo, en una célula huésped, organismo huésped, y/o sistema de expresión adecuado).

En un aspecto preferido, pero no limitante, una construcción genética de la invención comprende:

- 20 i) al menos un ácido nucleico de la invención; operativamente conectado a:
 - ii) uno o más elementos reguladores, tales como un promotor y opcionalmente un terminador adecuado;
- y opcionalmente también:
- iii) uno o más elementos adicionales de las construcciones genéticas conocidos por sí mismos;

25 en donde los términos "operativamente conectado" y "operativamente enlazado" tienen el significado dado en las páginas 131-134 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079; y en donde los "elementos reguladores", "promotor", "terminador" y "elementos adicionales" son como se describen en las páginas 131-134 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079; y en donde las construcciones genéticas pueden ser además como se describen en las páginas 131-134 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079.

30 Los ácidos nucleicos de la invención y/o las construcciones genéticas de la invención se pueden utilizar para transformar una célula huésped o un organismo huésped, es decir, para la expresión y/o producción del nanocuerpo biparatópico o del polipéptido de la invención. Los huéspedes o las células huésped adecuados quedarán claros para la persona experta, y, por ejemplo, pueden ser cualquier célula o línea celular fúngica, procariótica o eucariótica adecuada o cualquier organismo fúngico, procariótico o eucariótico adecuado, por ejemplo, aquéllos descritos en las páginas 134 y 135 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079.; así como todos los demás huéspedes o 35 células huésped conocidos por sí mismos para la expresión y producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (incluyendo, pero no limitándose a, anticuerpos de (un solo) dominio y fragmentos ScFv), lo cual quedará claro para la persona experta. También se hace referencia a la técnica antecedente general citada anteriormente en la presente, así como, por ejemplo, a las Publicaciones Internacionales Números WO 94/29457; WO 96/34103; y WO 99/42077; a Frenken et al. (1998), *supra*; a Riechmann y Muyldermans, (1999), *supra*; a van 40 der Linden, (2000), *supra*; a Thomassen et al. (2002), *supra*; a Joosten et al. (2003), *supra*; a Joosten et al. (2005), *supra*; y a las referencias adicionales citadas en la presente.

45 Los nanocuerpos biparatópicos y los polipéptidos de la invención también se pueden introducir y expresar en una o más células, tejidos u órganos de un organismo multicelular, por ejemplo, para los propósitos profiláticos y/o terapéuticos (por ejemplo, como una terapia genética), como se describe adicionalmente en las páginas 135 y 136 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079, y en las referencias adicionales citadas en la Publicación Internacional Número WO 08/020079.

50 Para la expresión de los nanocuerpos en una célula, también se pueden expresar como los denominados "intracuerpos", como se describen, por ejemplo, en las Publicaciones Internacionales Números WO 94/02610 y WO 95/22618; en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US-A-7004940; y en la Publicación Internacional Número WO 03/014960; en Cattaneo, A. y Biocca, S. (1997) *Intracellular Antibodies: Development and Applications*. Landes and Springer-Verlag; y en Kontermann, Methods 34, (2004), 163-170.

55 Los nanocuerpos biparatópicos y los polipéptidos de la invención, por ejemplo, también se pueden producir en la leche de los mamíferos transgénicos, por ejemplo, en la leche de los conejos, reses, cabras u ovejas (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números US-A-6,741,957, US-A-6,304,489 y US-A-6,849,992, para las técnicas generales para introducir transgenes en mamíferos), en plantas o partes de plantas, incluyendo, pero no limitándose a, sus hojas, flores, frutos, semillas, raíces, o tubérculos (por ejemplo, en el tabaco,

maíz, semilla de soya o alfalfa) o, por ejemplo, en las ninfas del gusano de seda *Bombyx mori*.

Adicionalmente, los nanocuerpos biparatópicos y los polipéptidos de la invención también se pueden expresar y/o producir en los sistemas de expresión sin células, y los ejemplos adecuados de estos sistemas quedarán claros para la persona experta. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, incluyen la expresión en el sistema del germen de trigo; en los lisados de reticulocitos de conejo; o en el sistema Zubay de *E. coli*.

Como se menciona anteriormente, una de las ventajas del uso de los polipéptidos biparatópicos y nanocuerpos es que los polipéptidos basados en los mismos se pueden preparar a través de la expresión en un sistema bacteriano adecuado, y los sistemas de expresión bacterianos, vectores, células huésped, elementos reguladores, etc. adecuados quedarán claros para la persona experta, por ejemplo, a partir de las referencias citadas anteriormente.

Sin embargo, se debe observar que la invención, en su sentido más amplio, no está limitada a la expresión en los sistemas bacterianos.

De preferencia, en la invención, se utiliza un sistema de expresión (*in vivo* o *in vitro*), tal como un sistema de expresión bacteriano, que proporcione los polipéptidos de la invención en una forma que sea adecuado para uso farmacéutico, y estos sistemas de expresión nuevamente estarán claros para la persona experta. Como también quedará claro para la persona experta, los polipéptidos de la invención adecuados para uso farmacéutico se pueden preparar utilizando las técnicas para la síntesis de péptidos.

Para la producción a una escala industrial, los huéspedes heterólogos preferidos para la producción (industrial) de los nanocuerpos biparatópicos o de los productos terapéuticos de proteína que contienen los nanocuerpos, incluyen cepas de *E. coli*, *Pichia pastoris*, *S. cerevisiae*, que son adecuados para la expresión/producción/fermentación a gran escala, y en particular, para la expresión/producción/fermentación farmacéutica a gran escala (es decir, de grado GMP). Los ejemplos adecuados de estas cepas quedarán claros para la persona experta. Estas cepas y los sistemas de producción/expresión también están disponibles en compañías tales como Biowitrum (Uppsala, Suecia).

De una manera alternativa, se pueden utilizar las líneas celulares de mamífero, en particular, las células de ovario de hámster chino (CHO), para la expresión/producción/fermentación a gran escala, y en particular, para la expresión/producción/ fermentación farmacéutica a gran escala. Nuevamente, estos sistemas de expresión/producción también están disponibles en algunas de las compañías mencionadas anteriormente.

La elección del sistema de expresión específico dependería en parte del requerimiento de ciertas modificaciones posteriores a la traducción, más específicamente de la glicosilación. La producción de una proteína recombinante que contenga el nanocuerpo para la cual se desee o se requiera la glicosilación, necesitaría del uso de huéspedes de expresión mamíferos que tengan la capacidad para glicosilar la proteína expresada. En este aspecto, quedará claro para la persona experta que el patrón de glicosilación obtenido (es decir, la clase, el número, y la posición de los residuos unidos) dependerá de la célula o línea celular que se utilice para la expresión. De preferencia, se utiliza ya sea una célula o una línea celular humana (es decir, que conduzca a una proteína que tenga esencialmente un patrón de glicosilación humano), o se utiliza otra línea celular de mamífero que pueda proporcionar un patrón de glicosilación que sea esencialmente y/o funcionalmente la misma que la glicosilación humana, o que al menos imite la glicosilación humana. En términos generales, los huéspedes procarióticos, tales como *E. coli*, no tienen la capacidad para glicosilar proteínas, y el uso de eucariotes inferiores, tales como levadura, usualmente conduce a un patrón de glicosilación que difiere de la glicosilación humana. No obstante, se debe entender que, en la invención, se pueden utilizar todas las células huésped y sistemas de expresión anteriores, dependiendo de el nanocuerpo biparatópico o polipéptido deseado que se vaya a obtener.

Por consiguiente, de acuerdo con un aspecto de la invención, el nanocuerpo biparatópico o el polipéptido de la invención está glicosilado. De acuerdo con otro aspecto no limitante de la invención, la secuencia de aminoácidos, el nanocuerpo, o el polipéptido de la invención, no está glicosilado.

De acuerdo con un aspecto preferido, pero no limitante, de la invención, el nanocuerpo biparatópico o el polipéptido de la invención se produce en una célula bacteriana, en particular, en una célula bacteriana adecuada para la producción farmacéutica a gran escala, tal como las células de las cepas mencionadas anteriormente.

De acuerdo con otro aspecto preferido, pero no limitante, de la invención, el nanocuerpo biparatópico o el polipéptido de la invención se produce en una célula de levadura, en particular, en una célula de levadura adecuada para la producción farmacéutica a gran escala, tal como las células de las especies mencionadas anteriormente.

De acuerdo con todavía otro aspecto preferido, pero no limitante, de la invención, el nanocuerpo biparatópico o el polipéptido de la invención se produce en una célula de mamífero, en particular, en una célula humana o en una célula de una línea celular humana, y más particularmente, en una célula humana o en una célula de una línea celular humana que sea adecuada para la producción farmacéutica a gran escala, tal como las líneas celulares mencionadas anteriormente en la presente.

Como se describe adicionalmente en las páginas 138 y 139 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079, cuando se utiliza la expresión en una célula huésped para producir los nanocuerpos biparatópicos y los polipéptidos de la invención, éstos se producen ya sea intracelularmente (por ejemplo, en el citosol, en el periplasma, o en los

- cuerpos de inclusión), y entonces se aíslan a partir de las células huésped, y de manera opcional, se purifican adicionalmente; o bien se pueden producir extracelularmente (por ejemplo, en el medio en donde se cultiven las células huésped), y entonces se aíslan a partir del medio de cultivo y de manera opcional, se purifican adicionalmente. Por consiguiente, de acuerdo con un aspecto no limitante de la invención, el nanocuerpo biparatópico o el polipéptido de la invención es una secuencia de aminoácidos, un nanocuerpo, o un polipéptido que se ha producido intracelularmente, y que se ha aislado a partir de la célula huésped, y en particular, a partir de una célula bacteriana o a partir de un cuerpo de inclusión en una célula bacteriana. De acuerdo con otro aspecto no limitante de la invención, el nanocuerpo biparatópico o el polipéptido de la invención es un nanocuerpo o polipéptido que se ha producido extracelularmente, y que se ha aislado a partir del medio en donde se cultive la célula huésped.
- 5 Algunos promotores preferidos, pero no limitantes, para utilizarse con estas células huésped, incluyen aquéllas mencionadas en las páginas 139 y 140 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079.
- Algunas secuencias secretoras preferidas, pero no limitantes, para utilizarse con estas células huésped, incluyen aquéllas mencionadas en la página 140 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079.
- 10 Las técnicas adecuadas para transformar un huésped o una célula huésped de la invención, quedarán claras para la persona experta, y pueden depender de la célula huésped/el organismo huésped pretendido, y de la construcción genética que se vaya a utilizar. Nuevamente, se hace referencia a los libros de texto y a las solicitudes de patente mencionadas anteriormente.
- 15 Después de la transformación, se puede llevar a cabo un paso para detectar y seleccionar las células huésped o los organismos huésped que se hayan transformado con éxito con la secuencia de nucleótidos/construcción genética de la invención. Éste, por ejemplo, puede ser un paso de selección basado en un marcador seleccionable presente en la construcción genética de la invención, o un paso que involucre la detección del polipéptido de la invención, por ejemplo, utilizando anticuerpos específicos.
- 20 La célula huésped transformada (la cual puede estar en la forma de una línea celular estable) o los organismos huésped (los cuales pueden estar en la forma de una línea o cepa mutante estable), forman aspectos adicionales de la presente invención.
- 25 De preferencia, estas células huésped o los organismos huésped son tales que expresan, o son (al menos) capaces de expresar (por ejemplo, bajo las condiciones adecuadas), un nanocuerpo biparatópico o el polipéptido de la invención (y en el caso de un organismo huésped: en al menos una célula, parte, tejido u órgano del mismo). La invención también incluye las generaciones, la progenie, y/o la descendencia adicional de la célula huésped o del organismo huésped de la invención, por ejemplo, que se pueda obtener mediante división celular o mediante reproducción sexual o asexual.
- 30 Para producir/obtener la expresión de las secuencias de aminoácidos de la invención, la célula huésped transformada o el organismo huésped transformado, en términos generales, se puede mantener y/o cultivar bajo condiciones tales que se exprese/produzca el nanocuerpo biparatópico o el polipéptido (deseado) de la invención.
- 35 Las condiciones adecuadas quedarán claras para la persona experta y usualmente dependerán de la célula huésped/el organismo huésped utilizado, así como de los elementos reguladores que controlen la expresión de la secuencia de nucleótidos (relevante) de la invención. Nuevamente, se hace referencia a los libros de texto y a las solicitudes de patente mencionadas anteriormente en los párrafos sobre las construcciones genéticas de la invención.
- 40 En términos generales, las condiciones adecuadas pueden incluir el uso de un medio adecuado, la presencia de una fuente adecuada de alimento y/o de nutrientes adecuados, el uso de una temperatura adecuada, y opcionalmente la presencia de un factor o compuesto de inducción adecuado (por ejemplo, cuando las secuencias de nucleótidos de la invención están bajo el control de un promotor inducible); todos los cuales pueden ser seleccionados por la persona experta. Nuevamente, bajo estas condiciones, el polipéptido de la invención se puede expresar de una manera constitutiva, de una manera transitoria, o solamente cuando se induzca de una manera adecuada.
- 45 También estará claro para la persona experta que el nanocuerpo biparatópico o el polipéptido de la invención se puede generar (primero) en una forma inmadura (como se menciona anteriormente), que entonces se puede someter a una modificación posterior a la traducción, dependiendo de la célula huésped/el organismo huésped utilizado. También, el nanocuerpo biparatópico o el polipéptido de la invención se puede glicosilar, nuevamente dependiendo de la célula huésped/el organismo huésped utilizado.
- 50 El nanocuerpo biparatópico o el polipéptido de la invención se puede aislar entonces a partir de la célula huésped/el organismo huésped, y/o a partir del medio en donde se haya cultivado la célula huésped o el organismo huésped, utilizando las técnicas de aislamiento y/o de purificación de proteínas conocidas por sí mismas, tales como las técnicas de cromatografía (de preparación) y/o electroforesis, las técnicas de precipitación diferencial, las técnicas de afinidad (por ejemplo, utilizando una secuencia de aminoácidos disociable específica fusionada con la secuencia de aminoácidos, el nanocuerpo, o el polipéptido de la invención) y/o las técnicas inmunológicas de preparación (es decir, utilizando los anticuerpos contra la secuencia de aminoácidos que se vaya a aislar).

En términos generales, para uso farmacéutico, los polipéptidos de la invención se pueden formular como una preparación farmacéutica o como composiciones que comprendan al menos un polipéptido de la invención, y al menos un vehículo, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Por medio de los ejemplos no limitantes, esta formulación puede estar en una forma adecuada para su administración oral, para su administración parenteral (tal como mediante inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea, o mediante o infusión intravenosa), para su administración tópica, para su administración mediante inhalación (por ejemplo, por medio de un nebulizador, inhalador de dosis medida (MDI), o inhalador de polvo seco (DPI), o por medio de la vía nasal), mediante un parche para la piel, mediante un implante, mediante un suppositorio, mediante la vía sublingual, etc. Estas formas de administración adecuadas - las cuales pueden ser sólidas, semi-sólidas, o líquidas, dependiendo de la forma de administración - así como los métodos y vehículos para utilizarse en la preparación de las mismas, quedarán claros para la persona experta, y se describen adicionalmente en la presente.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos un polipéptido biparatópico de la invención, de preferencia al menos un único dominio variable de inmunoglobulina biparatópico, y de una manera muy preferible, al menos un nanocuerpo biparatópico de acuerdo con la invención, y al menos un vehículo, diluyente o excipiente adecuado (es decir, adecuado para su uso farmacéutico), y opcionalmente una o más sustancias activas adicionales.

En términos generales, los polipéptidos biparatópicos de la invención se pueden formular y administrar de cualquier manera adecuada conocida por sí misma, para lo cual se hace referencia, por ejemplo, a la técnica antecedente general citada en lo anterior (y en particular, a las Publicaciones Internacionales Números WO 04/041862, WO 04/041863, WO 04/041865, WO 04/041867 y WO 08/020079), así como a los libros de texto convencionales, tales como Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Edición, Mack Publishing Company, EUA (1990), Remington, the Science and Practice of Pharmacy, 21^a Edición, Lippincott Williams and Wilkins (2005); o el Handbook of Therapeutic Antibodies (S. Dubel, Editor), Wiley, Weinheim, 2007 (véanse, por ejemplo, las páginas 252-255).

Por ejemplo, los polipéptidos biparatópicos de la invención se pueden formular y administrar de cualquier manera conocida por sí misma para los anticuerpos convencionales y los fragmentos de anticuerpos (incluyendo ScFvs y diacuerpos), y otras proteínas farmacéuticamente activas. Estas formulaciones y métodos para la preparación de las mismas, quedarán claros para la persona experta, y, por ejemplo, incluyen las preparaciones adecuadas para su administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intraluminal, intra-arterial o intratecal) o para administración tópica (es decir, transdérmica o intradérmica).

Las preparaciones para su administración parenteral, por ejemplo, pueden ser soluciones, suspensiones, dispersiones o emulsiones estériles que sean adecuadas para infusión o inyección. Los vehículos o diluyentes adecuados para estas preparaciones, por ejemplo, incluyen, sin limitación, aquéllos mencionados en la página 143 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079. Usualmente, se preferirán las soluciones o suspensiones acuosas.

Los polipéptidos biparatópicos de la invención, incluyendo los únicos dominios variables de inmunoglobulina biparatópicos y los nanocuerpos, también se pueden administrar empleando los métodos de suministro de la terapia genética. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,399,346, la cual se incorpora como referencia en su totalidad. Utilizando un método de suministro de terapia genética, las células primarias transfectedas con el gen que codifica un polipéptido biparatópico de la invención se pueden transfectar adicionalmente con los promotores específicos del tejido para dirigirse a órganos, tejidos, injertos, tumores, o células específicas, y adicionalmente se pueden transfectar con las secuencias de señales y de estabilización para la expresión subcelularmente localizada.

Por consiguiente, los polipéptidos biparatópicos, los únicos dominios variables de inmunoglobulina, y los nanocuerpos de la invención, se pueden administrar sistémicamente, por ejemplo, oralmente, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, se pueden comprimir en tabletas, o se pueden incorporar directamente con el alimento de la dieta del paciente. Para la administración terapéutica oral, los polipéptidos biparatópicos de la invención se pueden combinar con uno o más excipientes, y se pueden utilizar en la forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, trociscos, cápsulas, elíxires, suspensiones, jarabes, oblesas, y similares. Estas composiciones y preparaciones deben contener al menos el 0.1 % del polipéptido biparatópico, el único dominio variable de inmunoglobulina, o el nanocuerpo de la invención. Su porcentaje en las composiciones y preparaciones, desde luego, se puede variar, y de una manera conveniente, puede ser de entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 60 % del peso de una forma de dosificación unitaria dada. El polipéptido biparatópico de la invención en estas composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosificación efectivo.

Las tabletas, trociscos, píldoras, cápsulas, y similares también pueden contener aglutinantes, excipientes, agentes desintegrantes, lubricantes, y agentes edulcorantes o saborizantes, por ejemplo, aquéllos mencionados en las páginas 143-144 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, en adición a los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Puede haber otros diferentes materiales presentes como recubrimientos, o para

modificar de otra manera la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, las tabletas, píldoras, o cápsulas se pueden recubrir con gelatina, cera, shellac o azúcar, y similares. Un jarabe o elixir puede contener los nanocuerpos biparatópicos y los polipéptidos de la invención, sacarosa o fructosa como un agente edulcorante, metil- y propil-parabenos como conservadores, un tinte y saborizante, tal como saborizante de cereza o de naranja. Desde luego, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxica en las cantidades empleadas. En adición, los nanocuerpos, los únicos dominios variables de inmunoglobulina, y los polipéptidos biparatópicos de la invención se pueden incorporar en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

A las preparaciones y formulaciones para su administración oral también se les puede proporcionar un recubrimiento entérico que permita que las construcciones de la invención resistan el medio ambiente gástrico y pasen hacia los intestinos. En términos más generales, las preparaciones y formulaciones para su administración oral se pueden formular de una manera adecuada para su suministro hacia cualquier parte deseada del tracto gastrointestinal. En adición, se pueden utilizar supositorios adecuados para el suministro en el tracto gastrointestinal.

Los nanocuerpos, los únicos dominios variables de inmunoglobulina, y los polipéptidos de la invención también se pueden administrar intravenosamente o intraperitonealmente mediante infusión o inyección, como se describe adicionalmente en las páginas 144 y 145 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079.

Para la administración tópica, los nanocuerpos biparatópicos, los únicos dominios variables de inmunoglobulina, y los polipéptidos de la invención se pueden aplicar en una forma pura, es decir, cuando sean líquidos. Sin embargo, en términos generales, será deseable administrarlos a la piel como composiciones o formulaciones, en combinación con un vehículo dermatológicamente aceptable, el cual puede ser un sólido o un líquido, como se describe adicionalmente en la página 145 de la Publicación Internacional Número WO 08/020079.

En términos generales, la concentración de los nanocuerpos biparatópicos, los únicos dominios variables de inmunoglobulina, y los polipéptidos de la invención en una composición líquida, tal como una loción, será de aproximadamente el 0.1 al 25 % en peso, de preferencia de aproximadamente el 0.5 al 10 % en peso. La concentración en una composición semi-sólida o sólida, tal como un gel o un polvo, será de aproximadamente el 0.1 al 5 % en peso, de preferencia de aproximadamente el 0.5 al 2.5 % en peso.

La cantidad de los nanocuerpos biparatópicos, los únicos dominios variables de inmunoglobulina, y los polipéptidos de la invención, requerida para utilizarse en el tratamiento, variará no solamente con el nanocuerpo biparatópico o polipéptido particular seleccionado, sino también con la vía de administración, la naturaleza de la condición que se esté tratando, y la edad y condición del paciente, y estará por último a discreción del médico o clínico que atienda. También, la dosificación de los nanocuerpos biparatópicos y los polipéptidos de la invención varía dependiendo de la célula, tumor, tejido, injerto, u órgano objetivo.

La dosis deseada se puede presentar de una manera conveniente en una sola dosis o como dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más sub-dosis al día. La sub-dosis misma se puede dividir adicionalmente, por ejemplo, en un número de administraciones separadas flexiblemente espaciadas; tales como múltiples inhalaciones desde un insuflador, o mediante la aplicación de una pluralidad de gotas en los ojos.

Un régimen de administración podría incluir el tratamiento diario a largo plazo. "Largo plazo" significa al menos dos semanas, y de preferencia, varias semanas, meses, o años de duración. Las modificaciones necesarias en este intervalo de dosificación pueden ser determinadas por un experto ordinario en este campo utilizando solamente una experimentación de rutina dadas las enseñanzas de la presente. Véase Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., Ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. La dosificación también puede ser ajustada por el médico individual en el caso de cualquier complicación.

En otro de sus aspectos, la invención se refiere a un método para el tratamiento de las enfermedades o condiciones que involucran un funcionamiento aberrante de la transducción de señales del CXCR2, mediante la administración de una cantidad efectiva de un polipéptido o de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, y de preferencia, los únicos dominios variables de inmunoglobulina biparatópicos o los nanocuerpos o una composición que contenga los mismos de acuerdo con la invención. Como se discute en la presente, la transducción de señales del CXCR2 media una respuesta inflamatoria en los pulmones de los pacientes que padecen de una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) que provoca la destrucción del parénquima pulmonar. La migración de los leucocitos, que se ven en números elevados en los pulmones de los pacientes que padecen de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), es mediada por el CXCR2 sobre la superficie de tales células, y enlaza a varios ligandos, incluyendo IL-8, Gro- α , β , y, EMA 78 y GCP-2. Los mayores números de neutrófilos en los pulmones se correlacionan con la gravedad de la enfermedad. Además, la concentración de Gro- α es notoriamente elevada en el esputo inducido y en el fluido del lavado bronquial (BAL) de los pacientes con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD). De conformidad con lo anterior, se espera que el antagonismo con el CXCR2 prevenga, trate, o alivie los molestos síntomas de esta enfermedad.

De conformidad con lo anterior, la invención se refiere a los métodos para prevenir o tratar la enfermedad pulmonar

obstructiva crónica (COPD) o las exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), los cuales comprenden administrar un polipéptido biparatópico, tal como los únicos dominios variables de inmunoglobulina biparatópicos o los nanocuerpos de la invención, y en particular, las composiciones farmacéuticas de los mismos. La invención también se refiere al uso del polipéptido biparatópico, incluyendo los nanocuerpos biparatópicos y las composiciones que los contienen, para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y de las exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).

Será fácilmente evidente para el lector experto, que los polipéptidos biparatópicos de la invención, en particular los únicos dominios variables de inmunoglobulina biparatópicos o los nanocuerpos y las composiciones de los mismos, también son útiles en el tratamiento de otras enfermedades en donde esté involucrada una función aberrante de la transducción de señales del CXCR2, por ejemplo, otras condiciones del tracto respiratorio, tales como fibrosis quística, asma severo, las exacerbaciones de asma, asma alérgico, lesión pulmonar aguda, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, fibrosis pulmonar idiopática, remodelación de las vías respiratorias, síndrome de bronquiolitis obliterante, o displasia broncopulmonar.

Otras enfermedades y condiciones que se pueden prevenir o tratar mediante los polipéptidos biparatópicos de la invención, por ejemplo, mediante los únicos dominios variables de inmunoglobulina biparatópicos o los nanocuerpos y las composiciones farmacéuticas de los mismos, son ateroesclerosis, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria del intestino (de Crohn), angiogénesis, y enfermedades caracterizadas por nuevo desarrollo de vasos sanguíneos, incluyendo degeneración macular, retinopatía diabética y neuropatía diabética, esclerosis múltiple, soriasis, enfermedad degenerativa macular relacionada con la edad, enfermedad ocular de Behcet, uveítis, hipertensión arterial pulmonar (PAH), incluyendo hipertensión arterial pulmonar (PAH) idiopática, hipertensión arterial pulmonar (PAH) familiar e hipertensión arterial pulmonar (PAH) asociada, enfermedades inflamatorias crónicas, artritis reumatoide, osteoartritis, carcinoma no microcelular, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer esofágico, cáncer de ovario, cáncer de mama, tumores sólidos y metástasis, melanoma, carcinoma hepatocelular, o isquemia/lesión por reperfusión.

Otras enfermedades y condiciones que se pueden prevenir o tratar mediante los polipéptidos biparatópicos de la invención, por ejemplo, los únicos dominios variables de inmunoglobulina o nanocuerpos biparatópicos, y las composiciones farmacéuticas de los mismos, son crisis de oclusión de vaso inducida por transfusión hemolítica en la enfermedad drepanocítica, isquemia/lesión por reperfusión, embolia/infarto de miocardio agudo, lesión de cabeza cerrada, inflamación post-traumática y diabetes resistente a la insulina.

Para los métodos anteriores, los nanocuerpos biparatópicos, los únicos dominios variables de inmunoglobulina y/o los polipéptidos de la invención, y/o las composiciones que los comprenden, se pueden administrar de cualquier manera adecuada, dependiendo de la formulación o composición farmacéutica específica que se vaya a utilizar. Por consiguiente, los nanocuerpos y/o polipéptidos biparatópicos de la invención, y/o las composiciones que los comprenden, se pueden administrar, por ejemplo, oralmente, intraperitonealmente (por ejemplo, intravenosamente, sub-cutáneamente, intramuscularmente, o por medio de cualquier otra vía de administración que circunvenga el tracto gastrointestinal), intranasalmente, transdérmicamente, tópicamente, por medio de un suppositorio, mediante inhalación, nuevamente dependiendo de la formulación o composición farmacéutica específica que se vaya a utilizar. En general, para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), la inhalación no es una vía preferida. El médico podrá seleccionar una vía de administración adecuada y una formulación o composición farmacéutica adecuada para utilizarse en esta administración, dependiendo de las necesidades del paciente individual.

Los nanocuerpos biparatópicos, los únicos dominios variables de inmunoglobulina y/o los polipéptidos de la invención, y/o las composiciones que los comprenden, se administran de acuerdo con un régimen de tratamiento que sea adecuado para prevenir y/o tratar la enfermedad o el trastorno que se deba prevenir o tratar. El médico será capaz en general de determinar un régimen de tratamiento adecuado, dependiendo de factores tales como la enfermedad o el trastorno que se deba prevenir o tratar, la gravedad de la enfermedad que se vaya a tratar y/o la gravedad de los síntomas de la misma, los nanocuerpos, los únicos dominios variables de inmunoglobulina, o los polipéptidos biparatópicos específicos de la invención que se vayan a utilizar, la vía de administración específica y la formulación o composición farmacéutica que se vaya a utilizar, la edad, género, peso, dieta, y la condición general del paciente, y factores similares bien conocidos por el médico.

En términos generales, para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades y trastornos mencionados en la presente, en particular, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), la cantidad que se deba administrar dependerá de la potencia del nanocuerpo, el único dominio variable de inmunoglobulina, o el polipéptido biparatópico específico de la invención que se vaya a utilizar, de la vía de administración específica, y de la formulación o composición farmacéutica específica utilizada. En términos generales se administrará en una cantidad de entre 1 gramo y 0.01 microgramo por kilogramo de peso corporal al día, de preferencia de entre 0.1 gramo y 0.1 microgramo por kilogramo de peso corporal al día, tal como aproximadamente de 1, 10, 100 o 1,000 microgramos por kilogramo de peso corporal al día, ya sea continuamente (por ejemplo, mediante infusión), como una sola dosis al día, o bien como múltiples dosis divididas durante el día. El médico será capaz en general de determinar una dosis diaria adecuada, dependiendo de los factores mencionados en la presente. También quedará claro que en los casos específicos, el médico puede elegir desviarse de estas cantidades, por ejemplo, con base en los factores citados anteriormente y en su juicio experto.

Los nanocuerpos biparatópicos, los únicos dominios variables de inmunoglobulina, y los polipéptidos de la invención también se pueden utilizar en combinación con uno o más compuestos o principios farmacéuticamente activos adicionales, es decir, como un régimen de tratamiento combinado, el cual puede o no conducir a un efecto sinérgico. Nuevamente, el médico podrá seleccionar estos compuestos o principios adicionales, así como un régimen de tratamiento combinado adecuado, basándose en los factores citados anteriormente y en su juicio experto.

Por ejemplo, sería posible combinar los polipéptidos biparatópicos, tales como los nanocuerpos biparatópicos de la invención, con los tratamientos convencionales para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), tales como broncodilatadores β -adrenérgicos de corta y larga acción, anticolinérgicos inhalados (antagonistas muscarínicos), y corticosteroides inhalados.

- 10 La efectividad del régimen de tratamiento empleado de acuerdo con la invención, se puede determinar y/o seguir de cualquier manera conocida por sí misma para la enfermedad o el trastorno involucrado, como quedará claro para el médico. El médico también podrá, donde sea apropiado y sobre una base de caso por caso, cambiar o modificar un régimen de tratamiento particular, con el objeto de lograr el efecto terapéutico deseado, con el fin de evitar, limitar o reducir los efectos secundarios indeseados, y/o para alcanzar un equilibrio apropiado entre el logro del efecto terapéutico deseado por una parte, y el impedimento, la limitación, o la reducción de los efectos secundarios indeseados, por la otra parte.
- 15

En términos generales, el régimen de tratamiento será seguido hasta que se logre el efecto terapéutico deseado y/o siempre que se deba mantener el efecto terapéutico deseado. Nuevamente, esto puede ser determinado por el médico.

- 20 El sujeto que se vaya a tratar puede ser cualquier animal de sangre caliente, pero es en particular un mamífero, y más particularmente, un ser humano. Como quedará claro para la persona experta, el sujeto que se vaya a tratar será en particular una persona que padezca o que esté en riesgo de padecer de las enfermedades y los trastornos mencionados en la presente.

- 25 La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de los siguientes aspectos, ejemplos y figuras preferidos no limitantes.

Todas las publicaciones referidas en la presente se incorporan a la presente como referencia.

1. Clonación de CXCR2 humano y de cinomolgo

TABLA 1

CXCR2 humano SEQ ID NO: 1	MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSSTLPPFLDAAPCEPESLEINKYFVVIYALVFLLSLLGNSLVMVLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPPIWAASKVNGWIFGTFLLCKVVSLLKEVNFYSGILLACISVDRLAIVHATRRTLTKRYLVKFICLSIWGLSLLLALPVLLFRRTVYSSNVSPACYEDMGNNNTANWRMLLRILPQSFVFIVPLLIMLCYGFTRLTLFAHMGQKHRAMRVIFAVVLIFLLCWLPYNLVLLADTLMRTQVIQETCERRNHIDRALDATEILGILHSCLNPLIYAFIGQKFRHGLLKILAIHGLISKDSLPKDSRPSFVGSSSGHTSTTL
Δ 1-17 CXCR2 humano SEQ ID NO: 2	MEDLSNYSYSSTLPPFLDAAPCEPESLEINKYFVVIYALVFLLSLLGNSLVMVLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPPIWAASKVNGWIFGTFLLCKVVSLLKEVNFYSGILLACISVDRLAIVHATRRTLTKRYLVKFICLSIWGLSLLLALPVLLFRRTVYSSNVSPACYEDMGNNNTANWRMLLRILPQSFVFIVPLLIMLCYGFTRLTLFAHMGQKHRAMRVIFAVVLIFLLCWLPYNLVLLADTLMRTQVIQETCERRNHIDRALDATEILGILHSCLNPLIYAFIGQKFRHGLLKILAIHGLISKDSLPKDSRPSFVGSSSGHTSTTL

CXCR2 de cinomolgo SEQ ID NO: 3	MQSFNFEDFWENEDFSNYSYSSDLPPSLPDVAPCRPESLEINKYFVVIIYALVFLLSLL GNSLVMLVLHSRVGRSITDVYLLNLAMADLLFALTLPPIAAAKVNGWIFGTFLCKVVS LLKEVNFYSGILLACISVDRYLAIVHATRQLTQKRYLVKFVCLSIWSLSLLLALPVLLFR RTVYLTYISPVCYEDMGNNTAKWRMVLRILPQTFGFILPLIMLFCYGYTLRTLFAHM GQKHRAVRVIFAVVLIFLLCWLPYHLVLLADTLMRTRLINETCQRRNNIDQALDATEIL GILHSCLNPLIYAFIGQKFRHGLLKILATHGLISKDSRPSPVGSSSGHTSTTL
------------------------------------	--

El pcDNA3.1(+) (Invitrogen, V790-20) se diseña para la expresión constitutiva de alto nivel en una variedad de las líneas celulares de mamífero. Contiene el promotor inmediato-temprano del citomegalovirus humano, la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH), un marcador de selección de neomicina para células de mamífero, y un gen de resistencia a la ampicilina para la selección en *E. coli*.

5 El pVAX1 (Invitrogen, V260-20) es un vector de plásmido diseñado para vacunas de ADN. Contiene el promotor inmediato-temprano del citomegalovirus humano, la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH), y un gen de resistencia a la canamicina para la selección en *E. coli*.

TABLA 2

Construcciones:		
Receptor	Vector	Construcción
CXCR2 humano (marca 3xHA N-terminal)	pcDNA4/TO	Se subclonó una secuencia de ADN que codifica tres marcas HA seguida por la secuencia de hu CXCR2, agrupadas mediante un sitio de enzima de restricción HindIII y Xhol en los extremos 5' y 3', respectivamente, en pcDNA4/TO
CXCR2 quimera de CCR9 N-terminal humano (marca 3xHA N-terminal)	pcDNA4/TO	Se subclonó una secuencia de ADN que codifica tres marcas HA seguida por los primeros 39 aminoácidos para hu CCR9, un sitio de proteasa TEV, y la secuencia de hu CXCR2 menos los 43 aminoácidos N-terminales, agrupados mediante un sitio de enzima de restricción HindIII y Xhol en los extremos 5' y 3', respectivamente, en pcDNA4/TO
Δ 1-17 CXCR2 humano (marca 3xHA N-terminal)	pcDNA4/TO	Se subclonó una secuencia de ADN que codifica tres marcas HA seguida por la secuencia de hu CXCR2 que carece de los 17 aminoácidos N-terminales, agrupadas mediante un sitio de enzima de restricción HindIII y Xhol en los extremos 5' y 3', respectivamente, en pcDNA4/TO

Construcciones:		
Receptor	Vector	Construcción
CXCR2 humano	pXoon	El ADNc del CXCR2 humano (_h CXCR2) (GENBANK:L19593) se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un cebador 5' que contiene un sitio de disociación <i>EcoR</i> I y un cebador 3' que contiene un sitio <i>Not</i> I. El producto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ligó en un vector de plásmido pXOON
CXCR2 de cinomolgo	pcDNA3.1	El ADNc del CXCR2 de cinomolgo se amplificó a partir de una biblioteca de ADNc de bazo/timo de cinomolgo. Se agregaron los sitios de enzimas de restricción <i>Not</i> I y <i>Xhol</i> por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el fragmento resultante se clonó en pcDNA3.1
CXCR2 humano	pVAX1	PCR (NheI-NotI) sobre pXoon_hCXCR2
CXCR2 de cinomolgo	pVAX1	NheI-Xhol a partir de pcDNA3.1_cCXCR2
Δ1-17 CXCR2 humano	pVAX1	PCR (HindIII-Xhol) sobre pcDNA3.1_3xHA-Δ1-17-hCXCR2
Δ1-17 CXCR2 humano (marca 3xHA N-terminal)	pcDNA3.1	HindIII-Xhol a partir de pCR4Blunt-TOPO_3xHA-Δ1-17-hCXCR2
CXCR2 humano	pcDNA3.1	NheI-Xhol a partir de pVAX1_hCXCR2

2. Establecimiento de líneas celulares CHO, CaKi, RBL y HEK293T que expresan el CXCR2 humano y de cinomolgo

TABLA 3

Líneas celulares:			
Huésped	Transformación	Receptor	Vector
CHO	Estable	Δ1-17 CXCR2 Humano (marca 3xHA N-terminal)	pcDNA3.1
HEK293T	Transitoria	CXCR2 de cinomolgo	pcDNA3.1

Líneas celulares:			
Huésped	Transformación	Receptor	Vector
Info Caki para agregar			
/	Inmunización de ADN	CXCR2 Humano	pVAX1
/	Inmunización de ADN	CXCR2 de cinomolgo	pVAX1
/	Inmunización de ADN	Δ1-17 CXCR2 Humano	pVAX1
RBL	Estable	ADNc de CXCR2 humano	pSFFV-Neo
RBL -2H3	Estable	ADNc de CXCR2 de cinomolgo	pcDNA3.1
CHO-Trex	Estable	(HA)3-huCXCR2	pcDNA4/TO
CHO-Trex	Estable	(HA)3-huCCR9-huCXCR2	pcDNA4/TO
CHO-Trex	Estable	(HA)3-huCXCR2 ΔN1-17	pcDNA4/TO
L2071	Estable	CXCR1 Humano	pSFFV neo
CEM	Endógena	CXCR4	-

CHO-K1 Δ1-17 CXCR2 humano (marca 3xHA N-terminal)

Las células CHO-K1 se transfecaron con el plásmido pcDNA3.1_3xHA-Δ1-17-hCXCR2 utilizando el sistema de electroporación Amaxa (Programa U 23 en solución T). La reserva de células transfecadas se mantuvo bajo presión

- 5 de selección (1,000 microgramos/mlilitro de G418) a partir del día dos después de la transfección. Ocho días después, se identificó una población positiva para el CXCR2 humano con el uso de GRO-α humano marcado con Azul FMAT. El marcado con Azul FMAT del Gro-α humano (Biosource, PHC1063) se hizo utilizando el FMAT Blue Monofunctional Reactive Dye Kit (Kit de Tinte Reactivo Monofuncional Azul FMAT) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, 4328408). Las células individuales se clasificaron en placas de cultivo celular de 10 96 pozos utilizando un FACSaria (BD Biosciences). Los clones en crecimiento se probaron para determinar la expresión del Δ1-17 CXCR2 humano en un dispositivo FACSarray (BD Biosciences) con el uso de GRO-α humano marcado con Azul FMAT. Se seleccionaron los clones CHO-K1 con la expresión más alta (valor MCF de 9,000).

HEK293T CXCR2 de cinomolgo

- 15 Las células HEK293T se transfecaron con el plásmido pcDNA3.1_cCXCR2 utilizando el reactivo de transfección FuGene HD (Roche). Dos días después de la transfección, las células se probaron para determinar la expresión del cCXCR2 en un dispositivo FACSarray (BD Biosciences) con el uso de GRO-α marcado con Azul FMAT 50 nM. Las células con una buena expresión (valor MCF de alrededor de 12,000) se utilizaron adicionalmente.

RBL-2H3 CXCR2 de cinomolgo

Las células de leucemia de basófilos de rata (RBL-2H3), cultivadas a 37°C/CO₂ al 5 %, y rutinariamente subcultivadas en un medio de Eagle MEM (Invitrogen) complementado con 1X Aminoácidos No Esenciales, 0.15 % de Bicarbonato de sodio, piruvato de sodio 1 mM, y 15 % de suero bovino fetal (Invitrogen), se sometieron a nucleofección mediante electroporación (Amaxa Biosystems) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células transfectadas se incubaron a 37°C/CO₂ al 5 % y, 24 horas después de la transfección, se inició la selección del antibiótico mediante la adición de Geneticina hasta una concentración final de 1 miligramo/millilitro. Las células transfectadas se cultivaron y se subcultivaron durante 3 a 5 días en el medio de selección antes de someterse a la clasificación de células individuales mediante la dilución en serie en placas de 96 pozos. Después de aproximadamente dos semanas, las colonias que crecían activamente se expandieron y subsiguientemente se analizaron para determinar la expresión de la transcripción del CXCR2 de cinomolgo. Los clones positivos se expandieron entonces adicionalmente para el análisis.

CHO-Trex (HA)3-huCXCR2 y (HA)3huCCR9-CXCR2 híbrido

Las T-Rex de Ovario de hámster chino (T-Rex^{MR}-CHO, Invitrogen, #R718-07) se mantuvieron a 37°C como cultivos de una sola capa en un medio F12 de Ham que contenía L-Glutamina 2 mM, complementado con suero bovino fetal sin tetraciclina al 10 % (FBS) (Biosuero), Penicilina/Estreptomicina al 1 %, y 10 microgramos/millilitro de Blasticidina. Esta línea celular de expresión regulada por tetraciclina (T-Rex^{MR}) expresa establemente el represor de tetraciclina (TetR). Entonces se produjeron las líneas celulares que expresaban ambas construcciones de CXCR2, empleando un procedimiento de nucleofección (Cell line Nucleofector Kit T, Amaxa Biosystem, programa U-23). Las células transfectadas se incubaron a 37°C/CO₂ al 5 %, y se trataron con 300 microgramos/millilitro de Zeocina 48 horas después de la transfección. Las células se cultivaron durante un par de semanas en la presencia de Zeocina para permitir la selección de los transformantes positivos, después de lo cual, se llevó a cabo una clasificación de las células individuales utilizando el clasificador Mo-Flo FACS. Dos semanas después, se expandieron las colonias que crecían activamente mientras que se mantenían en su medio regular con una concentración de Zeocina de 300 microgramos/millilitro.

3. Gro-α Humano, Gro-α de cinomolgo, IL-8 humana, ENA-78 humano

TABLA 4

NVTS – IL-8, ENA-78, Gro-α de cinomolgo		
Ligando	Comentario	Fuente
GROα humano	recombinante	Biosource (PHC1063)
IL-8 Humano	recombinante	Novartis Viena
ENA-78 Humano	recombinante	Peprotech Ltd (300-22)
GROα de cinomolgo	recombinante	ALMAC Sciences

4. Péptidos

Los péptidos que representaban diferentes estiramientos de ciclo N-terminales y extracelulares (EL) del CXCR2 humano y de cinomolgo, se ordenaron en Bachem (Tabla 5). En los péptidos denominados como "cíclicos", el primero y el último aminoácidos fueron reemplazados por un residuo de cisteína, y las cisteínas internas que se presentaban naturalmente de la secuencia de tipo silvestre fueron reemplazadas por un residuo de leucina. Estos péptidos se ciclaron a través de los residuos de flanqueo de la cisteína.

TABLA 5

Nombre	Secuencia	Modificación
1 a 14 de Cinomolgo	MQSFNFEDFWENED SEQ ID NO: 4	Conjugado C-terminalmente con biotina
EL3 de Cinomolgo cíclico	CTLMRTRLINETLQRRNC SEQ ID NO: 5	Conjugado C-terminalmente con biotina o KLH
EL2 de Cinomolgo cíclico	CRRTVYLTYISPVLYEDMGNNTALWC SEQ ID NO: 6	Conjugado C-terminalmente con biotina o KLH
1 a 19 Humano	MEDFNMESDSFEDFWKGED SEQ ID NO: 7	Conjugado C-terminalmente con biotina
18 a 48 Humano	EDLSNYSYSSTLPPFLDAAPCEPESLEINK SEQ ID NO: 8	Conjugado C-terminalmente con biotina
EL2 Humano	FRRTVYSSNVSPACYEDMGNNTANWR SEQ ID NO: 9	Conjugado C-terminalmente con biotina o KLH
EL2 Humano cíclico	CRRTVYSSNVSPALYEDMGNNTANWC SEQ ID NO: 10	Conjugado C-terminalmente con biotina o KLH
EL3 Humano	DTLMRTQVIQETCERRNH SEQ ID NO: 11	Conjugado C-terminalmente con biotina o KLH
EL3 Humano cíclico	CTLMRQVIQETLERRNC SEQ ID NO: 12	Conjugado C-terminalmente con biotina o KLH

5. Inmunizaciones

Tres llamas se inmunizaron de siete a nueve veces con células de mamífero que expresan el CXCR2 humano y una

llama se inmunizó seis veces con células de mamífero que expresan el CXCR2 de cinomolgo. Este régimen fue seguido por cuatro administraciones de cócteles conjugados de péptido/hemocianina de lapa californiana (KLH) mezclados en adyuvante (in)completo de Freund, representando los péptidos los números de ciclos extracelulares 2 y 3 del CXCR2 tanto humano como de cinomolgo (Véase la Tabla 5). Otras ocho llamas se inmunizaron de cuatro a cinco veces con el ADN que codifica el CXCR2 humano de longitud completa o el Δ1-17 CXCR2 expresado a partir de pVAX1, seguidas por una administración de células de mamífero que expresan el CXCR2 humano de longitud completa. Tres llamas adicionales se inmunizaron cuatro veces con el ADN que codifica el CXCR2 de cinomolgo expresado a partir de pVAX1, seguidas por una administración de células de mamífero que expresan el CXCR2 de cinomolgo. Se tomaron muestras de sangre y ganglios linfáticos inmunes a los cuatro y ocho días después de la administración de cada uno de los antígenos.

6. Construcciones de bibliotecas

Se hicieron muestras de ADNc a partir de preparaciones de ARN total de las muestras de sangre y ganglios linfáticos inmunes. Las secuencias de nucleótidos que codificaban los nanocuerpos se amplificaron a partir de las muestras del ADNc de todas las llamas inmunizadas con el CXCR2 humano o de cinomolgo en una reacción RT-PCR de un solo paso, utilizando los cebadores ABL051, ABL052 y ABL003. Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla 6. Los amplicones de 700 pares de bases amplificados a partir de los ADNcx de IgG2 e IgG3 de la muestra se aislaron a partir del gel, y subsiguientemente se utilizaron como plantilla en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada, utilizando el cebador ABL050 que contenía el sitio de la enzima de restricción *Sfil*, y el cebador ABL003. Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se dirigieron subsiguientemente con *Sfil* y *BstEII* (que se presentan naturalmente en la FR4 de los genes *V_H*), y se ligaron en los sitios de restricción correspondientes del vector de fagémido pAX50, para obtener una biblioteca después de la electroporación en TG-1 de *Escherichia coli*. El pAX50 es un vector de expresión derivado a partir de pUC119, el cual contenía el promotor LacZ, una secuencia que codificaba la proteína de colifago pIII, un gen de resistencia para ampicilina o carbenicilina, un sitio de clonación múltiple, y la secuencia líder gen3. Dentro del marco, con la secuencia de codificación del nanocuerpo (Nanobody®), el vector codificó para una marca c-myc C-terminal y una marca (His)6. El vector de fagémido permite la producción de partículas de fagos, que expresan los nanocuerpos individuales como una proteína de fusión con el producto *genell*.

TABLA 6

Secuencias de los Cebadores

ABL051	GGCTGAGCTGGTGGTCCTGG	SEQ ID NO: 13
ABL052	GGCTGAGTTGGTGGTCCTGG	SEQ ID NO: 14
ABL003	GGTACGTGCTGTTGAAGTGTCC	SEQ ID NO: 15
ABL050	CATTGAGTTGGCTAGCCGCCATGGCAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGG GG	SEQ ID NO: 16
M13Fwd	TGTAAACGACGCCAGT	SEQ ID NO: 17
M13Rev	CAGGAAACAGCTATGACC	SEQ ID NO: 18
Rev_30GlySer	TCAGTAACCTGGATCCCCGCCACCGCTGCCTCCACCGCCGCTACCCCCGCCA CCGCTGCCTCCACCGCCTGAGGAGACGGTGACCTG	SEQ ID NO: 19

For_GlySer35	AGGTTACTGAGGATCCGGCGGTGGAGGCAGCGGAGGTGGGGCTCTGGTGGC GGGGTAGCGAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGG ID NO: 20	SEQ
Fwd-EVQL-MfeI	GAGGTGCAATTGGTGGAGTCTGGG	SEQ ID NO: 21
Rev-TVSS-BstEII	TGAGGAGACGGTGACCTGGTCCC	SEQ ID NO: 22
Fwd-EVQL-BamHI	TCTTGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGG	SEQ ID NO:23
Rev-TVSS-BspEI	ACCGCCTCCGGAGGGAGACCGTGACCTGGTCCC	SEQ ID NO: 24

7. Selecciones

Las bibliotecas de nanocuerpos pAX50 anteriormente mencionadas, expresadas sobre la superficie de los bacteriófagos, se seleccionaron utilizando péptidos, extractos de membrana, y células enteras presentadoras de epítopos de CXCR2.

Las selecciones utilizando péptidos consistieron en incubar las bibliotecas de fagos sobre 0 a 1,000 nM de los péptidos biotinilados (Véase la Tabla 5) capturados en placas de microtitulación Maxisorp (Pierce, 31000) recubiertas con neutravidina (Nunc, 430341). De una manera alternativa, las bibliotecas de fagos se incubaron en solución con el péptido biotinilado 10 nM, seguidos por la captura de los complejos de péptidos-fagos sobre

10 Dynabeads recubiertas con estreptavidina (Invitrogen, 112-06D). El bloqueo se llevó a cabo utilizando suero regulado con fosfato (PBS) complementado con caseína al 1 %. Se agregaron los fagos preparados a partir de las bibliotecas, y se incubaron durante 1 hora (en suero regulado con fosfato (PBS) complementado con caseína al 0.1 % y Tween20 al 0.1 %). Los fagos no enlazados se lavaron (con suero regulado con fosfato (PBS) complementado con Tween 20 al 0.05 %); los fagos enlazados se eluyeron mediante la adición de tripsina (1 miligramo/mlilitro en suero regulado con fosfato (PBS)) durante 15 minutos. Se llevaron a cabo segundas rondas de selección esencialmente como se describe anteriormente.

Las selecciones utilizando extractos de membrana se llevaron a cabo mediante el recubrimiento de los inmunotubos (Nunc, 444474) con 50 microgramos/mlilitro (proteína total) de extractos de membrana preparada a partir de las células que expresaban el CXCR2 humano (Perkin Elmer, ES-145-M400UA y 6110524400UA). Como un control negativo, los extractos de membrana preparados a partir de las células CHO que expresaban el FPR1 humano (Perkin Elmer, 6110527400UA) se recubrieron en paralelo. El bloqueo se llevó a cabo utilizando suero regulado con fosfato (PBS) complementado con leche descremada en polvo Marvel al 4 %. Los fagos se incubaron durante 2 horas (en suero regulado con fosfato (PBS) complementado con Marvel al 1 %). Los fagos no enlazados se lavaron con suero regulado con fosfato (PBS); los fagos enlazados se eluyeron mediante la adición de tripsina (1 miligramo/mlilitro en suero regulado con fosfato (PBS)) durante 15 minutos. Las segundas rondas de selección se llevaron a cabo esencialmente como se describe anteriormente. En algunos casos, los fagos que se enlazaron a epítopos del fondo celular irrelevantes, fueron específicamente consumidos mediante la absorción previa del fago en los tubos o pozos sucesivos recubiertos con los extractos de membrana de control. A continuación, se llevó a cabo la incubación sobre los extractos de membrana de CXCR2 humano recubiertos en la presencia del extracto de membrana de control en solución. En otros experimentos, una o dos rondas de selección sobre los péptidos fueron seguidas por una ronda de selección sobre los extractos de membrana, o viceversa.

En otro conjunto de experimentos, se incubaron de 1 a 5 millones de células de mamífero que expresaban el CXCR2 humano o de chinomolgo, con las bibliotecas de fagos en suero regulado con fosfato (PBS) complementado con suero bovino fetal al 10 % y leche descremada en polvo Marvel al 1 %. Las líneas celulares no transformadas se utilizaron como controles negativos. Los fagos no enlazados se lavaron con suero regulado con fosfato (PBS); los fagos enlazados se eluyeron mediante la adición de tripsina (1 miligramo/mlilitro en suero regulado con fosfato (PBS)) durante 15 minutos. Las segundas rondas se llevaron a cabo esencialmente como se describe anteriormente, pero sobre un fondo de línea celular diferente de la primera ronda.

En otros experimentos, los fagos se incubaron con extractos de membrana o células de mamífero que expresaban el CXCR2 en la presencia de 1 µM de péptidos (Véase la Tabla 5) en solución, para consumir los fagos que

expresaban los nanocuerpos que se enlazaron a las regiones representadas por estos péptidos.

8. Preparación de extractos periplásmicos

Los fagos eluidos se dejaron infectar las células TG-1 en crecimiento exponencial, las cuales entonces se aplicaron en placas de agar LB conteniendo carbenicilina. Los clones resistentes a la carbenicilina se analizaron para determinar la presencia del inserto y se verificaron las secuencias de los clones positivos. Los clones de interés se hicieron crecer en el medio TB complementado con carbenicilina, y se indujeron mediante la adición de IPTG para la expresión. La expresión se dejó continuar durante 4 horas a 37°C, seguida por la centrifugación de las células. Los aglomerados celulares congelados durante la noche a partir de los cultivos de expresión de *E. coli* se disolvieron en suero regulado con fosfato (PBS) (1/10 del volumen del cultivo original), y se incubaron a 4°C durante 1 hora bajo condiciones de agitación suave. Entonces, las células se centrifugaron una vez más, y se almacenó el sobrenadante, que contenía las proteínas secretadas en el espacio periplásmico.

9. Rastreo

Los extractos periplásmicos (como se describen anteriormente) se analizaron en FACS para la competencia con el Gro- α por el enlace al CXCR2 humano. Se incubaron 2×10^5 células con una dilución de ½ de los extractos periplásmicos en regulador FACS (suero regulado con fosfato (PBS) + suero bovino fetal al 10 % (Sigma, F7524)) durante 30 minutos a 4°C. Entonces, se agregó un volumen igual de 6 nM de GRO- α humano marcado con Azul FMAT en regulador FACS, y se continuó la incubación durante otros 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Las células luego se lavaron tres veces en regulador FACS, y finalmente se volvieron a suspender en regulador FACS. Las células muertas se tiñeron con yoduro de propidio (Sigma, P4170). Las muestras se analizaron entonces en un FACSarray (BD Biosciences). La Tabla 7 enumera los nanocuerpos cuyos extractos periplásmicos exhibieron la competencia con Gro- α sobre el CXCR2 humano.

TABLA 7

Competición de Gro- α sobre el CXCR2 humano (extractos periplásmicos)

Nombre	FACS de Competición de Gro- α (% de inhibición)
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

Nombre	FACS de Competición de Gro- α (% de inhibición)
144D1	32.7
145D3	77.9
147A1	58.3
146A6	42.7
145C9	53.5
163D2	86.8
163E3	80.1
2B2	38.1
Control de referencia	0.4

En otro establecimiento, los extractos periplásmicos se analizaron para determinar el enlace al péptido 1 a 19 humano mediante ELISA. Las placas MaxiSorb (Nunc, 430341) se recubrieron durante dos horas con neutravidina, seguida por una hora de bloqueo (suero regulado con fosfato (PBS), caseína al 1 %). Entonces, se agregó el péptido 1 a 19 humano biotinilado 100 nM a estas placas durante una hora (suero regulado con fosfato (PBS), caseína al 0.1 %, Tween 20 al 0.05 %), seguido por una hora de incubación con diluciones a 10 veces de los extractos periplásmicos.

- 5 Los extractos periplásmicos no enlazados se lavaron (suero regulado con fosfato (PBS) complementado con Tween 20 al 0.05 %), y se detectaron los nanocuerpos enlazados utilizando anti-myc de ratón (Roche, 11667149001), seguido por el conjugado de HRP-conejo anti-ratón (Dakocytomation, P0260). La Tabla 8 10 resume las proporciones de las señales de enlace de los nanocuerpos anti-CXCR2 sobre un nanocuerpo de control irrelevant.

TABLA 8

Enlace al péptido 1 a 19 del CXCR2 humano de los extractos periplásmicos

Nombre	ELISA del péptido 1-19 Nter (proporción de la señal de enlace en relación con el control de referencia)
54B12	75.5
53E7	13.3
97A9	0.8
127D1	39.5
137B7	1.0

Nombre	ELISA del péptido 1-19 Nter (proporción de la señal de enlace en relación con el control de referencia)
137A8	1.2
139A8	1.0
139D5	0.8
139H2	1.7
159B10	0.8
163D2	0.5
163E3	0.6
2B2	58.6

10. Secuencias

TABLA 9

Secuencias de nanocuerpos anti-CXCR2 monovalentes

143B03	SEQ ID NO: 25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYWMYWVRQAPGKG LDWVSAINAGGDSTYYADPVKGRFTISRDNNKNTLYLQMNSLKPED TALYYCATVRGTARDLDYWGQGTQVTVSS
139D05	SEQ ID NO: 26	EVKLVESGGGLVQAGGSLRLSCALSGRIGSINAMGWYRQVSGQQR ELVAVSRSGGSTDIADSVKGRFTISRDNGKNTVYLQMDSLKPEDTA VYYCYAHTSSYSNWRVYNNDYWGQGTQVTVSS
146A06	SEQ ID NO: 27	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLCAASGRIGTINAMGWYRQAPGKQR ELVAVITSGGRIDYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAV YYYNVETVVGAVYWGQGTQVTVSS
147A01	SEQ ID NO: 28	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRMGNIINAMGWYRQAPGKE RELVAKITRGGAITYADSVKGRFTIARDNLNTAYLQMNDLKPEDTAV YYYNDGGPSQNYWGQGTQVTVSS

145C09	SEQ ID NO: 29	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQAPGKER ERVSCISGSDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNNLKPEDT AVYYCAAYWGTLRLWMPPHRYDYWGQGTQTVSS
145D03	SEQ ID NO: 30	EVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCAASGLIFRLSGMAWYRQAPGRQR EWVAVLTKDGTLYADPVKGRFTISRNNAENTWYLQMNSLKPEDT AIYYCNTGRYWGQGTQTVSS
144D01	SEQ ID NO: 31	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGTIGTIRAMGWYRQAPGKQR ELVALITSTGRINYADSVKGRFTIGRDNNAKNTAYLQMNNLKPEDTAV YYYNIETLRRNYWGQGTQTVSS
139H02	SEQ ID NO: 32	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYAMGWFRQATGKE REFVAAINKSGGNTHYAGSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNSLKPRD TAVYYCAASRTNPKPDYWGQGTQTVSS
139A08	SEQ ID NO: 33	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFSRSAMGWLQRQAPGKE REFVAGISWGGSNYYADSVKGRFTISRDNNAKNTVSLQMNSLKPKQ DTAVYYCAARYRGGAAVAGWEYWGQGTQTVSS
137A08	SEQ ID NO: 34	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTLAYYTGVWFRRAPGKER EGISCISSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNSLKPEDTA VYYCAADRRRTDCKKGRVGSGSWGQGTQTVSS
143A05	SEQ ID NO: 35	KVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFNEYVMAWFRQAQGKE REFVAAISTRGSMTKYSDSVQGRFTISRDNNAKNTVYLHMNSLKPED TAVYYCAADPRGSSWSFSSGGYDYWGQGTQTVSS
137B07	SEQ ID NO: 36	EVQLVESGGGLVQPGGSVRRLSCVASGIIFRLSALGWTRQPGKAR EWVAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNNAKNTIYLHMDMLKPEDTA VYYCASGKYRGQGTQTVSS
127D01	SEQ ID NO: 37	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTDFKVMGWYRQPPGKQ REGVAIRLSGNMHYAEHSVKGRFTISKANAKNTVYLQMNSLRPEDT AVYYCKVNIRGQDYWGQGTQTVSS
126B11	SEQ ID NO: 38	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGSSFRINTMGWYRRAPGKQ RELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTISRDNNAKPTMYLQMNSLKPED TAVYYCHAGTQDRTGRNFDHWGQGTQTVSS
097A09	SEQ ID NO: 39	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQR ELVADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNTKNTVYLQMNSLKPEDTAV

		YYCNAEIVVLGVWTQRARTGNYWGQGTQTVSS
159B10	SEQ ID NO: 40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSSLMGWFRQAPGKE RAFVAALTRNGGYRYYADSVKGRFTISRDVAKTLYLQMNSLKPED TAVYYCAADSLSGSDYLTNLDYWQGTQTVSS
163D02	SEQ ID NO: 41	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSDYAMGWFRQAPGKE REFVAAITWNNGGRVFYTASVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPED TAVYYCAADKDRRTDYLGHPVAYWGQGTQTVSS
163E03	SEQ ID NO: 42	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKE REFVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNAKNTVYLMQNSLKPED DTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQTVSS
2B2	SEQ ID NO.:43	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQR ELVVRRTGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKTMYLQMNSLKPEDTA VYYCMLDDRGGVYWGQGTQTVSS
54B12	SEQ ID NO: 90	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQR ELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDNAKPTMYLQMNSLKPEDT AVYYCHAGTQDRTGRNFDRWGQGTQTVSS

Caracterización de Nanocuerpos Monovalentes

11. Construcción de nanocuerpos monovalentes

Los fragmentos de ADN que contenían nanocuerpos, obtenidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre los clones de fagémidos funcionales con los cebadores Fwd-EVQL-MfeI y Rev-TVSS-BstEII (Tabla 1), se dirigieron con *MfeI* y *BstEII*, se ligaron en el vector pAX100, y se transformaron en células competentes TG-1 de *E. coli*. pAX100 es un vector de expresión derivado a partir de pUC119 que contenía el promotor LacZ, un gen de resistencia a la canamicina, un sitio de clonación múltiple, y la secuencia líder OmpA. Dentro del marco con la secuencia de codificación del nanocuerpo, el vector codificó para una marca c-myc C-terminal y una marca His6. Los clones resistentes a la canamicina se analizaron para determinar la presencia del inserto, y se verificaron las secuencias de los clones positivos.

12. Expresión a pequeña escala

Las células TG-1 que contenían los vectores de expresión que codificaban los nanocuerpos de interés, se hicieron crecer en matraces de agitación con pantallas que contenían el medio TB más 100 microgramos/mlilitro de canamicina, y se indujeron mediante la adición de IPTG 1 mM para la expresión. La expresión se dejó continuar durante 4 horas a 37°C. Después de recolectar las células, se prepararon los extractos periplásmicos, y se purificaron los nanocuerpos marcados con His6 mediante cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (HisTrap FF Crude, GE Healthcare), seguido por la desalación (HiPrep 26/10, GE Healthcare) o la cromatografía con filtración en gel (Superdex 75 HR16/10, GE Healthcare) en suero regulado con fosfato (PBS).

20 13. Ensayo de competición de ligando

Los nanocuerpos anti-CXCR2 monovalentes purificados se titularon contra Gro-α marcado con Azul FMAT 3 nM en

el ensayo FACS de competición de ligando sobre el CXCR2 humano y de cinomolgo (Tabla 10). Sobre el CXCR2 humano, las potencias de bloqueo están en el intervalo de entre doble dígito nM y sub-nM, mientras que sobre el CXCR2 de cinomolgo, están en el intervalo de entre un solo dígito y doble dígito nM.

TABLA 10

5 Potencias de competición de ligando de los nanocuerpos anti-CXCR2 monovalentes

	CXCR2 humano		CXCR2 de cinomolgo	
	IC ₅₀ (M)	% de inhibición del max	IC ₅₀ (M)	% inhibición del max
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: no se pudo medir ninguna actividad.				

14. Ensayos funcionales utilizando líneas celulares recombinantes

(1) Medición de la liberación de calcio intracelular inducida por el agonista (FLIPR)

10 Las células RBL que expresaban el receptor CXCR2 ya sea humano o bien de cinomolgo se sembraron en placas de 96 pozos y se incuban durante la noche a 37°C. En el día del experimento, las células se cargaron con tinte Fluo-4 durante 30 minutos a 37°C, seguido por una incubación durante 30 minutos con los nanocuerpos anti-CXCR2 monovalentes purificados. Finalmente, se llevó a cabo la adición de GRO-α utilizando un lector de placas de toma de imágenes fluorométricas (FLIPR), seguida por la detección de una señal fluorescente, correspondiente a la liberación del calcio intracelular. Se llevó a cabo un ensayo de selectividad utilizando células L2071 que expresaban el CXCR1 humano. El protocolo del ensayo siguió siendo el mismo que se describe para CXCR2; sin embargo se utilizó IL-8 como el agonista. En la Tabla 11 se muestra un compendio de los valores IC₅₀ promedio; en adición, ninguno de los nanocuerpos probados mostró inhibición alguna de la liberación de calcio intracelular inducida por el agonista en el receptor CXCR1 en las concentraciones probadas (1 μM máxima concentración).

(2) Medición de la acumulación de [³⁵S]GTPγS estimulada por el agonista

Los nanocuerpos anti-CXCR2 monovalentes purificados se incubaron durante 60 minutos con GRO- α , GDP, perlas SPA, y membranas de CHO-CXC2, preparadas a partir de células CHO que expresaban el receptor CXCR2 humano, en una placa de 96 pozos. Esto fue seguido por la adición de [³⁵S]GTPyS, y una incubación adicional durante 60 minutos. Finalmente, la placa se centrifugó antes de leerse en el Topcount. En la Tabla 11 se muestra un compendio de los valores IC₅₀ promedio.

5

TABLA 11

Valores IC₅₀ para los nanocuerpos (Nanobodies®) anti-CXCR2 monovalentes purificados en los ensayos funcionales, utilizando líneas celulares recombinantes

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

* Las curvas se fijaron en la inhibición del 100 % debido a que no se obtuvo ninguna planicie en las concentraciones probadas. NA – no pudo medirse ninguna actividad. ND – no determinado.

10 15. Ensayos funcionales utilizando neutrófilos primarios

(1) *Ensayo de cambio de forma de neutrófilos en sangre entera humana (hWBSC)*

Los donadores fueron voluntarios normales sanos sin medicación sistémica (panel de donadores de Novartis Horsham). La sangre entera, anticoagulada con EDTA 52 mM (estéril) se recolectó en una proporción de 1 mililitro de EDTA a 9 mililitros de sangre. La sangre se recolectó a temperatura ambiente, y se calentó previamente hasta

15 37°C antes de usarse. 80 microlitros de sangre entera se incubaron previamente con los nanocuerpos CXCR2 durante 10 minutos a temperatura ambiente (respuesta de 10 puntos por dosis (0.03-1.144 x 10⁻⁷ μ M), antes de la estimulación con quimiocina); se agregaron 10 microlitros de rhGRO α (concentración aproximada EC₇₀ 2 nM) a todos los pozos, excepto el compuesto cero, al cual se agregaron 10 microlitros de regulador de ensayo de cambio

20 de forma. Las muestras se agitaron suavemente y se incubaron durante 5 minutos adicionales a 37°C. Los tubos se colocaron entonces sobre hielo, y se agregaron 250 microlitros de la solución CellFix^{MR} optimizada helada. Los tubos se agitaron suavemente, y se incubaron durante 5 minutos adicionales, después de cuyo tiempo, se agregaron 1.4

25 mililitros de solución de lisis 1X de cloruro de amonio a todos los tubos, y se dejaron sobre hielo durante 20 minutos adicionales. A continuación de la lisis de los glóbulos rojos, se analizaron las muestras en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). Las poblaciones de células se identificaron mediante compuerta de dispersión hacia adelante/dispersión lateral (FSC/SSC), seguida por las gráficas de FSC/FL-2 utilizando los granulocitos pasados desde la primera gráfica. Los neutrófilos se distinguieron de los eosinófilos en la gráfica de FL-2, debido a

que estos últimos tienen una auto-fluorescencia más alta. se contaron 5,000 eventos por muestra.

(2) Ensayo de quimiotaxis de neutrófilos humanos

Los donadores fueron voluntarios normales sanos sin medicación sistémica (panel de donadores de Novartis Horsham). Se recolectó la sangre entera anticoagulada con EDTA 52 mM (estéril) en una proporción de 1 mililitro de EDTA a 9 mililitros de sangre. Los leucocitos se aislaron empleando los protocolos convencionales: Se agregó dextrano al 4 % a 20 mililitros de sangre anticoagulada, se mezcló suavemente, y entonces se incubó sobre hielo durante 30 minutos, para permitir que se sedimentaran los glóbulos rojos sanguíneos. El sobrenadante que contenía las células mononucleares de sangre periférica (PMN) se puso entonces en capas en un gradiente de densidad Ficoll-Paque®, y se centrifugó a 300 x g durante 25 minutos a 18°C. La fracción rica en PMN se volvió a suspender en 500 microlitros de 1X suero regulado con fosfato (PBS), y se llevó a cabo la lisis de los glóbulos rojos utilizando choque hipotónico. Se agregaron al aglomerado 20 mililitros de agua destilada sin endotoxina estéril y helada, y se permitió que se presentara la lisis durante 30 a 40 segundos antes de agregar 20 mililitros de 2X suero regulado con fosfato (PBS). La muestra se mezcló suavemente, y se centrifugó a 300 x g durante 10 minutos a 18°C, para obtener los granulocitos. El aglomerado de granulocitos se volvió a suspender en 500 microlitros de 1x suero regulado con fosfato (PBS), y se lavó dos veces con 50 mililitros de 1x suero regulado con fosfato (PBS). El aglomerado de granulocitos se volvió a suspender en RPMI 1640, pH de 7.4, más suero bovino fetal (FBS) al 2.5 %, se contó, y se diluyó hasta una concentración final de $2e^6$ /mililitro. La migración se midió utilizando placas Transwell con membranas de PET de 3 micras de Becton Dickinson. Dicho de una manera breve, se agregaron 6 nM de rhGROα (EC₈₀-EC₁₀₀) a los pozos inferiores (1,000 microlitros/pozo) de la placa antes de bajar a su posición el inserto de múltiples pozos, y entonces se agregó al inserto el PMN que se había incubado previamente con concentraciones variables del nanocuerpo (de 0.13 a 1,000 nM para los monovalentes, o de 0.6pM a 30 nM para los biparatópicos) durante 30 minutos a temperatura ambiente (500 microlitros/pozo). Luego las placas se incubaron a 37°C durante 90 minutos, y se contaron las células que habían migrado hasta la cámara del fondo, utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur. El citómetro de flujo se ajustó para contar el número de eventos dentro de la compuerta R2 en la gráfica de FSC/FL-2 durante un tiempo establecido de 20 segundos por muestra.

(3) Ensayo de cambio de forma de neutrófilos de sangre entera de cinomolgo (CinoWBSC)

La sangre venosa tomada ya sea del antebrazo o bien de la pierna, se anticoaguló con citrato de sodio al 3.8 % (estéril) en una proporción de 1 mililitro de citrato de sodio a 9 mililitros de sangre. La sangre se recolectó a temperatura ambiente, y se calentó previamente hasta 37°C antes de usarse. 80 microlitros de sangre entera se incubaron previamente con los nanocuerpos CXCR2 durante 10 minutos a temperatura ambiente (respuesta de 10 puntos por dosis ($0.03\text{-}1.144 \times 10^{-7}$ μM)), antes de la estimulación con quimiocina; se agregaron 10 microlitros de rhGROα (concentración EC₇₀₋₉₀ aproximada de 30 nM) a todos los pozos excepto el compuesto cero, al cual se le agregaron 10 microlitros de regulador de ensayo de cambio de forma. Las muestras se agitaron suavemente y se incubaron durante 5 minutos adicionales a 37°C. Los tubos se colocaron entonces sobre hielo, y se agregaron 250 microlitros de solución CellFix^{MR} optimizada helada. Los tubos se agitaron suavemente, y se incubaron durante 5 minutos adicionales, después de cuyo tiempo, se agregaron 2 mililitros de regulador de lisis (Sigma Aldrich #R7757) a todos los tubos, y se dejaron sobre hielo durante 40 a 60 minutos adicionales. A continuación de la lisis de los glóbulos rojos, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). Las poblaciones de células se identificaron mediante compuerta de dispersión hacia adelante/ dispersión lateral (FSC/SSC), seguida por gráficas de FSC/FL-2, utilizando los granulocitos pasados a partir de la primera gráfica. Los neutrófilos se distinguieron de los eosinófilos en la gráfica de FL-2, debido a que éstos últimos tienen una auto-fluorescencia más alta. Se contaron 5,000 eventos por muestra.

TABLA 12

Valores IC₅₀ para los nanocuerpos anti-CXCR2 monovalentes purificados en los ensayos funcionales utilizando neutrófilos primarios y rhGROα

	WBSC Humano IC ₅₀ (nM)	WBSC de Cinomolgo IC ₅₀ (nM)	Quimiotaxis Humana IC ₅₀ (nM)
163D2	6.6 + 3.1	>100	ND
127D1	4.9 + 2.9	>100	14 + 9.4

	WBSC Humano IC ₅₀ (nM)	WBSC de Cinomolgo IC ₅₀ (nM)	Quimiotaxis Humana IC ₅₀ (nM)
97A9	11.6 + 5.47	>100	48.5 + 31
163E3	9.4 + 6.2	>100	9.3 + 4
54B12	19.7	>100	ND
2B2	29.5 + 23.4	>100	212 + 121

Nanocuerpos multivalentes

16. Construcción de nanocuerpos bivalentes

Se emplearon dos planteamientos para construir los nanocuerpos bivalentes.

- 5 Se ejecutaron amplificaciones mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre el ADN del plásmido que codificaba los bloques de construcción monovalentes. El bloque de construcción N-terminal se amplificó utilizando Fwd-EVQL-Mfcl y un cebador en reversa que codificaba parte del enlazador GlySer, mientras que el bloque de construcción C-terminal se amplificó utilizando un cebador hacia adelante que codificaba la parte restante del enlazador GlySer y Rev-TVSS-BstEII (Tabla 6). El fragmento N-terminal se digirió con Mfcl y BamHI, el fragmento C-terminal se digirió con BamHI y BstEII; y éstos entonces se ligaron simultáneamente en el vector pAX100, y se transformaron en células competentes TG-1 de *E. coli*.
- 10 De una manera alternativa, se ejecutaron diferentes amplificaciones mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre el ADN del plásmido que codificaba los bloques de construcción monovalentes. El bloque de construcción N-terminal se amplificó utilizando Fwd-EVQL-Mfcl y Rev-TVSS-BspEI, mientras que el bloque de construcción C-terminal se amplificó utilizando Fwd-EVQL-BamHI y Rev-TVSS-BstEII (Tabla 6). El fragmento N-terminal se digirió con Mfcl y BamHI, el fragmento C-terminal se digirió con BspEI y BstEII. El fragmento N-terminal se ligó (Mfcl-BspEI) en un derivado de pAX100 que contenía la información de codificación para el enlazador GlySer, y se transformó en células competentes TG-1 de *E. coli*. Se preparó el ADN del plásmido a partir de esta mezcla de la transformación, y se digirió con BspEI y BstEII, y entonces el fragmento C-terminal se ligó en el vector pAX100 y se transformó en células competentes TG-1 de *E. coli*.

- 15 Los clones resistentes a la canamicina se analizaron para determinar la presencia del inserto, y se verificaron las secuencias de los clones positivos.
- 20

17. Secuencias de nanocuerpos anti-CXCR2 multivalentes

TABLA 13

CXCR20011	97A9-35GS- 97A9 SEQ ID NO: 44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAVGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCN AEIVVLGVWWTQRARTGNYWGQGTQTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS GSIVRINTMGWYRQTPGKQRELVADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNT KNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNAEIVVLGVWWTQRARTGNYWGQGT QVTVSS
-----------	--	--

CXCR20012	137B7-35GS-137B7 SEQ ID NO: 45	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGIIFRLSALGWTRQPGKAREW VAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNAKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYC ASGKYRGQGTQVTVSSGGGSGGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGIIFRLSALGWTRQ GPGKAREWVAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNAKNTIYLHMDMLKP EDTAVYYCASGKYRGQGTQVTVSS
CXCR20013	2B2-35GS-97A9 SEQ ID NO: 46	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VVRRTTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYC MLDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSGGGGGGGGGGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTM GWYRQTPGKQRELVADITSGGNINYDAVKGRFTISRDNTKNTVYLOM NSLKPEDTAVYYCNAEIVLVGVWTQRARTGNYWGQGTQVTVSS
CXCR20014	97A9-35GS-2B2 SEQ ID NO: 47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYDAVKGRFTISRDNTKNTVYLOMNSLKPEDTAVYYCN AEIVVLGVWTQRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSGGGGG GGGGSGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GSILTINAMGWYRQAPGKQRELVVRRTTRGGSTTYQDSVKGRFTISADI AKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
CXCR20015	2B2-35GS-137B7 SEQ ID NO: 48	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VVRRTTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYC MLDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGSGGGGSGGGGGGGGGGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGELVQPGGSLRLSCVASGIIFRLSALG WTRQPGKAREWVAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNAKNTIYLHM DMLKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
CXCR20016	137B7-35GS-2B2 SEQ ID NO: 49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGIIFRLSALGWTRQPGKAREW VAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNAKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYC ASGKYRGQGTQVTVSSGGGSGGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGSEVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYR QAPGKQRELVVRRTTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLK PEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
CXCR20017	97A9-35GS-137B7 SEQ ID NO: 50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYDAVKGRFTISRDNTKNTVYLOMNSLKPEDTAVYYCN AEIVVLGVWTQRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGGGGGGGG GGGGSGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVA SGIIFRLSALGWTRQPGKAREWVAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRD NAKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYCASGKYRGQGTQVTVSS
CXCR20018	137B7-35GS-97A9 SEQ ID NO: 51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGIIFRLSALGWTRQPGKAREW VAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNAKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYC ASGKYRGQGTQVTVSSGGGSGGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYR QTPGKQRELVADITSGGNINYDAVKGRFTISRDNTKNTVYLOMNSLK EDTAVYYCNAEIVLVGVWTQRARTGNYWGQGTQVTVSS

CXCR20019	2B2-9GS-2B2 SEQ ID NO: 52	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VVRRTTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYC MLDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGELVQPG GSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQRELVVRRTTRGGSTTYQDS VKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGT QVTVSS
CXCR20020	127D1-35GS-163D2 SEQ ID NO: 53	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTDFKVMGWYRQPPGKQRE GVAAILSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYY CKVNIRGQDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDY MGWFRQAPGKEREVFVAITWNGGRVFYTASVKGRFTISRDNAKNTMY LQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHGVAYWGQGTQVTVSS
CXCR20021	127D1-35GS-163E3 SEQ ID NO: 54	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTDFKVMGWYRQPPGKQRE GVAAILSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYY CKVNIRGQDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAM GWFRQAPGKEREVFVAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
CXCR20022	163D2-35GS-163D2 SEQ ID NO: 55	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKERE FVAITWNGGRVFYTASVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHGVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGGGGGG SGGGGGSGGGGGSGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAA SGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREVFVAITWNGGRVFYTASVKGRFTIS RDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHGVAYWGQG TQVTVSS
CXCR20023	163D2-35GS-163E3 SEQ ID NO: 56	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKERE FVAITWNGGRVFYTASVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHGVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGGGGGG SGGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVA SRIFSSNAMGWFRQAPGKEREVFVAITWRSGGSAYYADSAKGRFTI SRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQ VTVSS
CXCR20024	163E3-35GS-163E3 SEQ ID NO: 57	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKERE FVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAV YYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGGGGGG GGGGGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASG RIFSSNAMGWFRQAPGKEREVFVAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVT VSS

CXCR20025	163D2-35GS-127D1 SEQ ID NO: 58	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKERE FVAAITWNGGRVFYTASVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHPVAYWGQGTQTVSSGGGGSGGGGGGGGGGGGG SGGGGGSGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGESRLSCAA SGSTDFKVMGWYRQPPGKQREGVAIRLSGNMHYAESVKGRFTISK ANAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQTVSS
CXCR20026	163E3-35GS-127D1 SEQ ID NO: 59	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKERE FVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAV YYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQTVSSGGGGSGGGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGESRLSCAASG STFDFKVMGWYRQPPGKQREGVAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKAN AKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQTVSS
CXCR20027	163E3-35GS-163D2 SEQ ID NO: 60	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKERE FVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAV YYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQTVSSGGGGSGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RTFSFYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGGRVFYTASVKGRFTISRD NAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHPVAYWGQGTQ VTVSS
CXCR20028	97A9-35GS-54B12 SEQ ID NO: 61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYDAVKGRFTISRDNTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCN AEIVVLGVWVTQRARTGNYWGQGTQTVSSGGGGSGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVS GSTFRINTMGWYRRAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDN NAKPTMYLQMNSLKPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFDRWGQGTQTV SS
CXCR20029	163E3-35GS-54B12 SEQ ID NO: 62	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKERE FVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAV YYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQTVSSGGGGSGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSG STFRINTMGWYRRAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDN NAKPTMYLQMNSLKPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFDRWGQGTQTV S
CXCR20030	163D2-35GS-54B12 SEQ ID NO: 63	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKERE FVAAITWNGGRVFYTASVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHPVAYWGQGTQTVSSGGGGSGGGGGGGGGGGGGGG SGGGGGSGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAV SGSTFRINTMGWYRRAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSR DNAKPTMYLQMNSLKPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFDRWGQGTQTV VSS

CXCR20031	2B2-35GS-163E3 SEQ ID NO: 64	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VVRRTTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYC MLDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGGGGGGGGGGGG GSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAM GWFRQAPGKEREFAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQTVSS
CXCR20032	2B2-35GS-163D2 SEQ ID NO: 65	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VVRRTTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYC MLDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGGGGGGGGGG GSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCASGRFTSDYA MGWFRQAPGKEREFAITWNNGRVFYTASVKGRFTISRDNAKNTMY LQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHGPVAYWGQGTQTVSS
CXCR20033	163E3-35GS-2B2 SEQ ID NO: 66	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKERE FVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAV YYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASG SILTINAMGWYRQAPGKQRELVVRRTTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIA KKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQTVSS
CXCR20034	163D2-35GS-2B2 SEQ ID NO: 67	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSDYAMGWFRQAPGKERE FVAAITWNNGRVFYTASVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHGPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAA SGSILTINAMGWYRQAPGKQRELVVRRTTRGGSTTYQDSVKGRFTISAD IAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQTVSS
CXCR20035	54B12-35GS-163E3 SEQ ID NO: 68	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQREL VAARDRGGYINYVDSVKGRFTSRDNAKPTMYLQMNSLKPEDTAVYY CHAGTQDRTGRNFDRWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGGGGGGGG GSGGGGSGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRI FSSNAMGWFRQAPGKEREFAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQTVVS
CXCR20036	54B12-35GS-163D2 SEQ ID NO: 69	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQREL VAARDRGGYINYVDSVKGRFTSRDNAKPTMYLQMNSLKPEDTAVYY CHAGTQDRTGRNFDRWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGGGGGGGG GSGGGGSGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCASGRFT FSDYAMGWFRQAPGKEREFAITWNNGRVFYTASVKGRFTISRDNA KNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHGPVAYWGQGTQVT VSS

18. Ensayo de competición de ligando

Los nanocuerpos anti-CXCR2 multivalentes se titularon contra Gro- α marcado con Azul FMAT 3 nM en el ensayo FACS de competición de ligando sobre el CXCR2 humano y de cinomolgo (Tabla 14). En el CXCR2 humano, las potencias de bloqueo están en el intervalo de entre doble dígito nM y sub-nM, mientras que en CXCR2 de cinomolgo, están en el intervalo de entre un solo dígito y doble dígito nM.

ES 2 687 654 T3

TABLA 14

Análisis de competición de ligando de los nanocuerpos anti-CXCR2 multivalentes

		CXCR2 humano		CXCR2 de cinomolgo	
		IC ₅₀ (M)	% de inhibición del max	IC ₅₀ (M)	% de inhibición del max
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

ES 2 687 654 T3

		CXCR2 humano		CXCR2 de cinomolgo	
		IC ₅₀ (M)	% de inhibición del max	IC ₅₀ (M)	% de inhibición del max
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-	1.00E-09	99.0 %	3.23E-09	99.0 %

		CXCR2 humano		CXCR2 de cinomolgo	
		IC ₅₀ (M)	% de inhibición del max	IC ₅₀ (M)	% de inhibición del max
	163E3				
CXCR20036	54B12-35GS-163D2	7.00E-10	98.0 %	2.27E-09	98.0 %
ND: no determinado.					

19. Ensayos funcionales utilizando líneas celulares recombinantes

(1) *Medición de la liberación de calcio intracelular inducida por el agonista (FLIPR)*

Las células RBL que expresaban ya sea el receptor del CXCR2 humano o bien de cinomolgo se sembraron en placas de 96 pozos y se incubaron durante la noche a 37°C. En el día del experimento, las células se cargaron con tinte Fluo-4 durante 30 minutos a 37°C, seguidos por una incubación durante 30 minutos con nanocuerpos anti-CXCR2 multivalentes purificados. Finalmente, se llevó a cabo la adición de GRO-α utilizando un lector de placas de toma de imágenes fluorométricas (FLIPR), seguida por la detección de una señal fluorescente, correspondiente a la liberación de calcio intracelular. Los ensayos de selectividad se llevaron a cabo utilizando células L2071 que expresaban el CXCR1 humano, con IL-8 como el agonista, y células CEM que expresaban endógenamente el CXCR4 humano con SDF-1 como el agonista; sin embargo, el protocolo del ensayo siguió siendo el mismo que se describe para CXCR2. En la Tabla 15 se muestra un compendio de los valores IC₅₀ promedio; en adición, ninguno de los nanocuerpos probados mostró inhibición alguna de la liberación de calcio intracelular inducida por el agonista ya sea en el CXCR1 o en el CXCR4 en las concentraciones probadas (máxima concentración de 1 μM).

(2) *Medición de la acumulación de [³⁵S]GTPyS estimulada por el agonista*

Los nanocuerpos anti-CXCR2 multivalentes purificados se incubaron durante 60 minutos con el agonista (GRO-α, IL-8 o ENA-78) GDP, perlas SPA, y membranas de CHO-CXC2, preparadas a partir de células CHO que expresaban el receptor CXCR2 humano, en una placa de 96 pozos. Esto fue seguido por la adición de [³⁵S]GTPyS y una incubación adicional durante 60 minutos. Finalmente, la placa se centrifugó antes de leerse en el Topcount. En la Tabla 15 se muestra un compendio de los valores IC₅₀ promedio.

TABLA 15

Valores IC₅₀ para los nanocuerpos anti-CXCR2 multivalentes purificados en un ensayo funcional que mide la liberación de calcio intracelular utilizando líneas celulares recombinantes

		CXCR2 humano		CXCR2 de cinomolgo	
		IC ₅₀ (M)	% de inhibición del max	IC ₅₀ (M)	% de inhibición del max
CXCR20011	97A9-35GS-97A9	1.37E-7	100	ND	ND
CXCR20012	137B7-35GS-137B7	ND	ND	ND	ND

ES 2 687 654 T3

		CXCR2 humano		CXCR2 de cinomolgo	
		IC ₅₀ (M)	% de inhibición del max	IC ₅₀ (M)	% de inhibición del max
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

ES 2 687 654 T3

		CXCR2 humano		CXCR2 de cinomolgo	
		IC ₅₀ (M)	% de inhibición del max	IC ₅₀ (M)	% de inhibición del max
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

		CXCR2 humano		CXCR2 de cinomolgo	
		IC ₅₀ (M)	% de inhibición del max	IC ₅₀ (M)	% de inhibición del max
CXCR20036	54B12-35GS-163D2	7.86E-9	100	4.27E-9	100
* Las curvas se fijaron en el 100 % de inhibición debido a que no se obtuvo ninguna planicie en las concentraciones probadas. ND – no determinado.					

TABLA 16

Valores IC₅₀ para los nanocuerpos anti-CXCR2 multivalentes purificados en un ensayo funcional que mide la acumulación de [³⁵S]GTPγS en las membranas de células CHO-CXCR2 humanas

		CXCR2 humano (utilizando agonistas diferentes)					
		GRO-α		IL-8		ENA-78	
		IC ₅₀ (M)	% de inhibición de max	IC ₅₀ (M)	% de inhibición de max	IC ₅₀ (M)	% de inhibición de max
CXCR 20014	97A9-35GS-2B2	1.38E-9	100	1.13E-9	100	1.66E-9	100
CXCR 20020	127D1-35GS-163D2	6.34E-10	100	6.19E-10	100	7.07E-10	100
CXCR 20021	127D1-35GS-163E3	5.51E-10	100	8.27E-10	100	7.87E-10	100
CXCR 20022	163D2-35GS-163D2	2.85E-8	100	ND	ND	ND	ND

ES 2 687 654 T3

		CXCR2 humano (utilizando agonistas diferentes)					
		GRO-α		IL-8		ENA-78	
		IC ₅₀ (M)	% de inhibición de max	IC ₅₀ (M)	% de inhibición de max	IC ₅₀ (M)	% de inhibición de max
CXCR 20023	163D2-35GS-163E3	2.66E-8	100	ND	ND	ND	ND
CXCR 20024	163E3-35GS-163E3	3.03E-8	100	ND	ND	ND	ND
CXCR 20025	163D2-35GS-127D1	8.91E-10	100	ND	ND	ND	ND
CXCR 20026	163E3-35GS-127D1	8.09E-10	100	ND	ND	ND	ND
CXCR 20028	97A9-35GS-54B12	1.38E-9	100	ND	ND	ND	ND
CXCR 20030	163D2-35GS-54B12	1.02E-9	100	1.09E-9	100	1.30E-9	100
CXCR 20031	2B2-35GS-163E3	ND	ND	8.40E-10	100	1.38E-9	100
CXCR 20032	2B2-35GS-163D2	ND	ND	9.97E-10	100	1.16E-10	100
CXCR 20033	163E3-35GS-2B2	1.01E-9	100	ND	ND	ND	ND
CXCR 20034	163D2-35GS-2B2	9.95E-10	100	ND	ND	ND	ND
CXCR-20035	54B12-35GS-163E3	8.44E-10	100	7.17E-10	100	1.17E-9	100

		CXCR2 humano (utilizando agonistas diferentes)					
		GRO-α		IL-8		ENA-78	
		IC ₅₀ (M)	% de inhibición de max	IC ₅₀ (M)	% de inhibición de max	IC ₅₀ (M)	% de inhibición de max
ND – no determinado							

(3) Análisis de Schild para determinar el mecanismo de acción de los nanocuerpos anti-CXCR2

El análisis de Schild se llevó a cabo utilizando ensayos de acumulación de [³⁵S]GTPyS estimulada por IL-8 y GRO-α. Este formato de ensayo permite equilibrar el agonista y el nanocuerpo antes de la adición de [³⁵S]GTPyS y, como una consecuencia, se deben evitar cualesquiera artificios del hemi-equilibrio que pudieran conducir a una mala interpretación del mecanismo. Para hacer esto, se determinaron las curvas de respuesta a la concentración del agonista en la presencia de concentraciones crecientes del nanocuerpo. Los datos para dos nanocuerpos monovalentes 54B12 y 163E3 y el nanocuerpo multivalente resultante se dan como ejemplos y se muestran en la Figura 1. Los datos muestran las curvas de respuesta a la concentración para GRO-α, pero se observaron datos similares cuando se utilizó la IL-8.

Los nanocuerpos monovalentes 54B12 y 163E3 muestran ambos un mecanismo de acción aloestérico, pero con efectos diferenciales sobre la inhibición del agonista. El mecanismo aloestérico de 54B12 y otros enlazadores 1-19 se ejemplifica mediante cambios paralelos hacia la derecha de la curva de respuesta a la concentración del agonista con bajas concentraciones del nanocuerpo, que no cambian adicionalmente hacia la derecha en la presencia de concentraciones crecientes del nanocuerpo (Figura 1(a)). La naturaleza saturable de este efecto, sin una disminución de la máxima respuesta al agonista, indica los efectos aloestéricos sobre la afinidad del agonista. En contraste, el mecanismo aloestérico del 163E3 y otros enlazadores que no son 1-19 se ejemplifica mediante cambios paralelos hacia la derecha de la curva de respuesta a la concentración del agonista en combinación con las reducciones en la máxima respuesta al agonista con concentraciones más altas del nanocuerpo (Figura 1(b)). Este efecto puede ser saturable pero no se observó esto en las concentraciones empleadas; sin embargo, la observación clave es la reducción en la máxima respuesta al agonista, que indica los efectos aloestéricos sobre la eficacia del agonista. Finalmente, el nanocuerpo 54B12-163E3 biparatópico combina ambos mecanismos aloestéricos para producir efectos sobre la curva de respuesta a la concentración del agonista, los cuales se ejemplifican mediante cambios paralelos hacia la derecha, en concentraciones mucho más bajas del nanocuerpo, y una disminución significativa de la máxima respuesta al agonista. (Figura 1(c)). También se probaron los nanocuerpos biparatópicos 127D1-163E3, 127D1-163D2 y 54B12-163D2 y se demostró que tienen propiedades similares (no se muestran los datos).

En la Figura 2 también se muestran las mismas propiedades que se ilustran en la Figura 1, lo cual muestra que - cuando se probaron para determinar su capacidad para inhibir el GRO-α - una molécula de enlace representativa 127D1 es potente, pero no es eficaz, mientras que otra molécula de enlace 163E3 tiene una potencia más baja, pero es más eficaz que la 127D1. Cuando se combinan las dos moléculas de enlace, se muestra que la molécula de enlace biparatópica resultante es tanto potente como eficaz. En conclusión, se ha demostrado que las moléculas biparatópicas de la invención tienen mejores propiedades en términos de eficacia y potencia que los nanocuerpos monoméricos. Los valores IC₅₀ se ilustran en la siguiente Tabla.

35

Nanocuerpo	IC ₅₀ (M) en la concentración especificada (nM) de GROα				
127D1	1.642E-09	2.045E-09	3.264E-09	4.602E-09	
163E3	3.031E-08	4.044E-08	7.543E-08	1.868E-07	

Nanocuerpo	IC ₅₀ (M) en la concentración especificada (nM) de GROα			
163E3-127D1	6.532E-10	1.983E-09	1.614E-08	6.713E-08

- 5 La definición actual de un modulador aloestérico es que se enlaza en un sitio distinto del sitio de enlace del agonista (ligando ortoestérico), y que tanto el ligando ortoestérico como el modulador aloestérico se enlazan al receptor al mismo tiempo. Aunque los inventores actualmente no tienen los datos para confirmar esto, y no desean obligarse por la teoría, no se cree que el sitio de enlace del nanocuerpo sea distinto del sitio de enlace del agonista, sino que los sitios de enlace se traslanan. Tampoco hay datos disponibles para mostrar que tanto el agonista como el nanocuerpo se enlazan al receptor al mismo tiempo, aunque los datos del análisis de Schild sugerirían que estos nanocuerpos son moduladores aloestéricos del CXCR2.

10 20. Ensayos funcionales – NSC

Los métodos son los mismos que se describen en la sección 15

TABLA 17

Valores IC₅₀ para los nanocuerpos anti-CXCR2 biparatópicos purificados en ensayos funcionales utilizando neutrófilos primarios humanos o de cinomolgo (contra rhGROα, promedio + SD)

15

	WBSC Humano IC ₅₀ (nM)	WBSC de cinomologo IC ₅₀ (nM)	Quimiotaxis Humana IC ₅₀ (nM)
97A9-2B2	0.445 + 0.08	0.16 + 0.16	0.16 + 0
163D2-2B2	0.29 + 0.17	0.44 + 0.14	0.143 + 0.003
163E3-2B2	0.345 + 0.15	0.42 + 0.12	0.15 + 0.02
127D1-163D2	0.17	0.12 + 0.09	0.143 + 0.009
163E3-127D1	0.165 + 0.06	0.26 + 0.25	0.14 + 0.006
97A9-54B12	0.43 + 0.18	1.72 + 0.43	ND
163D2-54B12	0.215 + 0.02	0.56 + 0.46	ND
54B12-163E3	0.24 + 0.155	0.43 + 0.38	ND

TABLA 18

143B03	SEQ ID NO: 192	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTCAGT ACCTACTGGATGTATTGGTCCCGTCAGGCTCAGGGAAAGGGGCTC GACTGGGTCTCAGCTATTAAATGCTGGTGGTATAGCACATACTATG CAGACCCCCGTGAAGGGCCGATTCAACCATCTCCAGAGACAACAA GAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACG GCCCTGTATTACTGTGCCACCGTAGCAGGGCACAGCTCGTACTTGG ACTACTGGGGCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
139D05	SEQ ID NO: 193	GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAAGGATCGGCAGT ATCAACGCCATGGGCTGGTATGCCAGGTTCAAGGACAACAGCGC GAGTTGGTCGAGTAACGAGGAGCGGAGGTAGCACAGACATTGCT GACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACCATCTCCAGAGACAACGGCAAGA ACACAGTGTATCTGCAGATGGACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGC CGTCTATTACTGTTATGCTCATCTCAAGCTATAGTAATTGGCGAG TCTACAATAACGACTACTGGGGCAGGGGACCCAGGTACCGTCTC CTCA
146A06	SEQ ID NO: 194	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGG GGGGTCTCTGAGACTTACCTGTGCAGCCTCTGGACGCATCGGCACT ATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCAGGGAAAGCAGCGC GAGTTGGTCGAGTTATTACTAGTGGTGGTAGGATAGACTATGCAG ACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAA CACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCC GTCTATTACTATAATGTAGAAACGGTAGTGGGTGCCGTACTGGG GCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
147A01	SEQ ID NO: 195	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAAGGATGGCAAT ATCAATGCCATGGGCTGGTATGCCAGGCTCAGGGAAAGGAGCGC GAGTTGGTCGAAAAATTACTAGGGGTGGTGCATAACCTATGCAG ACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACCATGCCAGAGACAATATTCTGAA CACGGCGTATCTGCAAATGAACGACCTGAAACCTGAGGACACGGCC GTCTATTATTATAATGTAGATGGGGGCCAGTCAGTCAGTCAGTC GCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
145C09	SEQ ID NO: 196	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCGAT GATTATGCCATAGGCTGGTCCGCCAGGCCCCAGGGAAAGGAGCGT GAGAGGGTCTCATGTATTAGTGGTAGTGTAGTCAGCACATACTATG CAGACTCCGTCAAGGGCCGATTCAACCATCTCCAGTGACAACGCCAA GAACACGGTGATCTGCAAATGAACAAACCTGAAACCCGAGGACACG GCCGTTTATTATTGTGCAGCATATTGGGGACTAACGCTCAGGCTATG GATGCCCCCCCACCAGGTATGACTACTGGGGCAGGGGACCCAGGT CACCGTCTCCTCA

145D03	SEQ ID NO: 197	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGGCTGG GGGTCTCTGAGCCTCTCTGTGCAGCCTCTGGACTATCTCAGA CTCAGTGGCATGGCCTGGTATGCCAGGCTCCGGGAGGCAGCGC GAGTGGTCGAGTGCTAACAAAGATGGTACCCCTACACTATGCAG ACCCCGTGAAGGGCCGATTACCACCTCCAGAAACAAACGCCGAGAA CACGTGGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACAGCC ATCTATTACTGTAATACGGGCCGTTACTGGGCCAGGGGACCCAGG TCACCGTCTCCTCA
144D01	SEQ ID NO: 198	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGGCTGG GGGTCACTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGAACCATCGGCAC GATCAGAGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAAGCAGCG CGAGTTGGTCGCATTGATTACTAGTACTGGTAGGATAAAACTATGCAG ACTCCGTGAAGGGCCGATTACCACATTGGAAAGAGACAATGCCAAGAA CACGGCGTATCTGCAAATGAACAAACCTGAAACCTGAGGACACGCC GTCTATTACTATAATATCGAAACACTACGACGTAACACTACTGGGCCA GGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
139H02	SEQ ID NO: 199	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGATTGGTGCAGGCTGG GGGTCTCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTAGT AACTATGCCATGGGCTGGTCCGCCAGGCCACAGGGAAAGGAGCGT GAGTTTAGCAGCTATTAAACAAGAGTGGTGGAACACACACTATG CAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCACCTCCAGAGACAACGCCAA GAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTAGGGACACG GCCGTTATTACTGTGCAGCGTCGGACTAACCTAACGCTGACT ACTGGGCCAGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
139A08	SEQ ID NO: 200	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGATTGGTGCAGGCTGG GGGTCTCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGACGCCTCCTCAGT CGCAGTGCATGGCCTGGCTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGAGCGT GAATTGTAGCAGGTATTAGCTGGGTGGTGTATAACTCATACTATGC AGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCACATCTCCAGAGACAACGCCAAG AACACCGTGTCTACAAATGAACAGCCTGAAACCTCAGGACACGG CCGTTATTACTGTGCAGCAAGATAACGGGGAGGCGGGCAGTAG CTGGTGGAGTACTGGGCCAGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
137A08	SEQ ID NO: 201	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGGCTGG GGGTCTCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCCGGATCCACTTTGCC TATTATACCGTAGGCTGGTCCGCCGGGCCAGGGAAAGGAGCGC GAGGGGATCTCATGTATTAGTAGTGTAGTGTAGCACATACTATGC AGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCACATCTCCAGAGACAATGCCAAG AATACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGG CCGTTATTACTGTGCAGCGCTGACAGACGTACCGACTGTAAAAAGGG TAGAGTCGGTTCTGGTCTGGGCCAGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
143A05	SEQ ID NO: 202	AAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGGCTGG GGGTCTCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCCGGACCCGCCTCAAT TACTATGTCTGGCCTGGTCCGCCAGGCTCAAGGGAAAGGAGCGT GAGTTTAGCAGCTATTAGCACCGTGGTAGTATGACAAGTATT AGACTCCGTGCAGGGCCGGTTACCACATCTCCAGAGACAACGCCAA GAACACGGTGTATCTGCACATGAACAGCCTGAAACCTGAGGATAACG GCCGTTATTACTGTGCAGCAGACCCCTCGCAGTAGCTGGTCAT TTCGTCCGGGGTTATGACTACTGGGCCAGGGACCCAGGTACCGT CCGTCTCCTCA

137B07	SEQ ID NO: 203	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGG GGGGTCTGTGAGACTCTCTGTAGCCTCTGGAATCATCTTCAGA CTCAGTGCCTGGGTTGGACACGCCAGGGTCCAGGAAAGGCGCGC GAGTGGGTCGAGGTATTAAACAGTGATGGTACGACCAACTACGCCG ACCCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAA CACGATATATCTGCACATGGACATGCTGAAACCTGAGGATAACGCC GTCTATTACTGTGCCTCCGGAAAGTACCGGGCCAGGGGACCCAG GTCACCGTCTCCTCA
127D01	SEQ ID NO: 204	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGG GGAGTCTCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGAAGCACCTTCGAT TTCAAAGTCATGGCTGGTACCGCCAGCCTCCAGGGAAAGCAGCGC GAGGGGGTCGAGCGATTAGGCTTAGTGGTAACATGCACTATGCAG AGTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCAAAGCCAACGCCAAGAA CACAGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGCC GTCTATTACTGTAAAGGTGAACATTGGGGCCAGGACTACTGGGCC AGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
126B11	SEQ ID NO: 205	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGG GGGGTCTCTGACGCTCTCTGTGCAGTCTGGAAGCTCCTTCAGA ATCAATACCATGGCTGGTACCGCCGGCTCAGGGAAAGCAGCGC GAGTTGGTCGAGCTCGTGTAGAGGGTGGTACATAAACTATGTAG ATTCCGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAACGCCAAGCC CACAAATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGCC GTCTATTATTGTCAATGCCGGACCCAAGATCGGACGGTCGGAATT TCGACCACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
097A09	SEQ ID NO: 206	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGG GGGGTCTCTGAGACTCTCTGTAGCCTCTGGAAGCATCGTCAGA ATTAATACCATGGCTGGTACCGCCAGACTCCAGGGAAAGCAGCGC GAGTTGGTCGAGATATTACAGTGGTGGTAACATAAACTATATAGA CGCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAAC ACGGGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGCC TCTATTACTGTAAATGCAGAGATCGTTCTGGTGGAGTTGGACC CAGCGTGCACGGGACCGGCAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGT CACCGTCTCCTCA
159B10	SEQ ID NO: 207	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCCTGG GGGGTCTCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGACGCACGTTCA AGCTGTCCATGGCTGGTCCGCCAGGCTCCGGGGAAAGGAGCGT GCCTTGAGCAGCCTACTCGAAATGGTGGTACAGATACTATGC AGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACGTCGCCAAG AAGACCTTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACCG CCGCTCTATTACTGTGCAGCAGATAGTCTTAGGGTAGTGACTACTA GGAACCAACCTAGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCGTC TCCTCA
163D02	SEQ ID NO: 208	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGG GGGGTCTCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTCAGT GAATGCCATGGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGAGCGT GAGTTGTAGCAGCTATTACGTGGAATGGTGGTAGAGTATTTATAC TGCCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG AACACGATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACCG CCGTTTATTACTGTGCAGCAGATAAGACAGACGACTGACTATCTA GGGCACCCCGTTGCCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCGTC TCCTCA

ES 2 687 654 T3

163E03	SEQ ID NO: 209	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCCTGG GGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGACGCATCTTCAGT AGCAATGCCATGGGCTGGTCCGCCAGGCTCAGGGAAAGGAGCGT GAGTTGTAGCGGCCATTACCTGGAGGAGTGGCGGTAGCGCGTAC TATGCAGACTCCCGAAGGGCGATTCACCATCTCCAGAGACAACG CCAAGAACACGGTGTATTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGA CACGGCCGTTATTATTGTGCAGCTGGTGGTAGTTCCCTGGTTAAGTT TTCCGCCGGACTACTGGGCCAGGGACCCAGGTACCGTCTCCT CA
2B2	SEQ ID NO: 210	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGAGTTGGTGCAGCCGGG GGGGCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAAGCCTTAAC ATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCAGGGAAAGCAGCGC GAGTTGGTAGTCCGTAGGACTAGGGGTGGTAGTACAACGTATCAAG ACTCCGTGAAGGGCGATTCACCATCTCCGCAGACATTGCCAAGAA AACGATGTATCTCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGACACGGCC GTCTATTACTGTATGCTAGATGACCGTGCCCCGTACTGGGT AGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
54B12	SEQ ID NO: 211	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGG GGGGCTCTGACGCTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAAAGCACCTTCAGA ATCAATACCATGGGCTGGTACCGCCGGGCTCAGGGAAAGCAGCGC GAGTTGGTCGAGCTCGTGTAGAGGTGGTTACATAAAACTATGTAG ATTCCGTGAAGGGCGATTCACCGTCTCCAGAGACAACGCCAAGCC CACAAATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCC GTCTATTATTGTCATGCCGGGACCCAAGATCGGACGGTCAACGTCTCCTCA TCGACCGCTGGGCCAGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA

Panel Principal-CDR+FR CXCR2 Kabat

TABLA 19

	Estructura 1	CDR1	Estructura 2	CDR2	Estructura 3	CDR3	Estructura 4
143B03	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG RTFS SEQ ID NO: 70	TYWMY SEQ ID NO: 132	WVRQAPGKGLDW VS SEQ ID NO: 91	AINAGGDSTYY ADPVKG SEQ ID NO: 152	RFTISRDNNKNTVYL QMNSLKPEDTALYYC AT SEQ ID NO: 111	VRGTARDLDY SEQ ID NO: 172	WGQGTQTVSS SEQ ID NO: 131
139D05	EVKLVESGGGLVQ AGGSLRLSCALSG RIGS SEQ ID NO: 71	INAMG SEQ ID NO: 133	WYRQVSGQQRELV A SEQ ID NO: 92	VSRSGGSTDIA DSVKG SEQ ID NO: 153	RFTISRDNGKNTVYL QMDSLKPEDTAVYY CYA SEQ ID NO: 112	HTSSYSNWRVYN NDY SEQ ID NO: 173	WGQGTQTVSS SEQ ID NO: 131
145C09	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAASG FTFD SEQ ID NO: 72	DYAIG SEQ ID NO: 134	WFRQAPGKERERV S SEQ ID NO: 93	CISGSDGSTYY ADSVKG SEQ ID NO: 154	RFTISSDNAKNTVYL QMNNLKPEDTAVYY CAA SEQ ID NO: 113	YWGLTLRLWMPP HRYDY SEQ ID NO: 174	WGQGTQTVSS SEQ ID NO: 131
145D03	EVQLVESGGGLVQ AGGSLSLSCAASGL IFR SEQ ID NO: 73	LSGMA SEQ ID NO: 135	WYRQAPGRQREW VA SEQ ID NO: 94	VLTKDGTLYA DPVKG SEQ ID NO: 155	RFTISRNNAENTVYL QMNSLKPEDTAVYYC NT SEQ ID NO: 114	GRY SEQ ID NO: 175	WGQGTQTVSS SEQ ID NO: 131
139H02	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAASG RTFS SEQ ID NO: 74	NYAMG SEQ ID NO: 136	WFRQATGKEREVF A SEQ ID NO: 95	AINKSGGNTHY AGSVKG SEQ ID NO: 156	RFTISRDNAKNTVYL QMNSLKPDRDTAVYY CAA SEQ ID NO: 115	SRTNPKPDY SEQ ID NO: 176	WGQGTQTVSS SEQ ID NO: 131

	Estructura 1	CDR1	Estructura 2	CDR2	Estructura 3	CDR3	Estructura 4
139A08	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRSCAASG RSFS	RSAWG SEQ ID NO: 137	WLRQAPGKEREVF A	GISWGGDNSYY ADSVKG	RFTISRDNAKNTVSL QMNSLKPQDTAVYY CAA	RYRGAAVAGW EY	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO: 131
137A08	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG STLA	YYTVG SEQ ID NO: 138	WFRRAPGKEREVG S	CISSDGSTYYA DSVKG	RFTISRDNAKNTVYL QMNSLKPEDTAVYY CAA	DRRTDKKGRV/G SGS	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO: 177
143A05	KVQLVESGGGLVQ AGGSLRSCAASG RAFN	YYVMA SEQ ID NO: 139	WFRQAQQGKEREVF A	AISTRGSMTKY SDSVQG	RFTISRDNAKNTVYL HMNSLKPEDTAVYY CAA	DPRGSSWSFSSG GYDY	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO: 131
137B07	EVQLVESGGGLVQ PGGSVRRLSCVAVSGI IFR	LSALG SEQ ID NO: 140	WTRQGPGBKAREW VA	GINSDDTTNYA DPVKG	RFTISRDNAKNTVYLH MDMLKPEDTAVYYC AS	GKY	RGQGTQVTVSS SEQ ID NO: 132
127D01	EVQLVESGGGLVQ AGESLRSCAASG STFD	FKV/MG SEQ ID NO: 141	WYRQPPGKQREG VA	AIRLSGNMHYA ESVKG	RFTISKANAKNTVYL QMNSLRPEDTAVYY CKV	NIRQDY	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO: 131
126B11	EVQLVESGGGLVQ AGGSLLTLSCAVSG SSFR	INTMG SEQ ID NO: 142	WYRRAPGKQRELV A	ARDRGGYINYY DSVKG	RFTVSRDNAKPTMYL QMNSLKPEDTAVYY CHA	GTQDRTGRNFDH	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO: 131

	Estructura 1	CDR1	Estructura 2	CDR2	Estructura 3	CDR3	Estructura 4
	SEQ ID NO: 80				SEQ ID NO: 121		
097A09	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCVASG SIVR	INTMG	WYRQAPGKQRELV A	DITSGGNINYD AVKG	RFTISRDNTKNTVYL QMNSLKPEDTAVYY CNA	EIVVLVGVWTQR ARTGNY	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO: 133
159B10	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG RTFS	SLSMG	WFRQAPGKERAfv A	ALTRNGGYRYY ADSVKG	RFTISRDVAKKTLYLQ MNSLKPEDTAVYYCA A	DLSGSDFYLGTN LDY	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO: 131
163D02	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAASG RTFS	DYAMG	WFRQAPGKEREfv A	ATWNNGGRVfy TASVKG	RFTISRDNAKNTMYL QMNSLKPEDTAVYY CAA	DKDRRTDYLGHF VAY	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO: 131
163E03	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCVASG RIFS	SNAMG	WFRQAPGKEREfv A	ATWRSGGSAy YADSAKG	RFTISRDNAKNTVYL QMNSLKPEDTAVYY CAA	GGSSWLSFPFDY	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO: 131
002B02	EVQLVESGGELVQ PGGSLRLSCAASG SILT	INAMG	WYRQAPGKQRELV V	RRTRGGSTTYQ DSVKG SEQ ID NO: 167	RFTISADIAKTMYLQ MNSLKPEDTAVYYC ML	DDRGGVY	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO: 131
	SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 106	SEQ ID NO: 126	SEQ ID NO: 125	SEQ ID NO: 186	SEQ ID NO: 187

	Estructura 1	CDR1	Estructura 2	CDR2	Estructura 3	CDR3	Estructura 4
146A06	EVQLVESGGGLVQ AGGSRLTCAAASG RIGT SEQ ID NO: 86	INAMG SEQ ID NO: 148	WYRQAPGKQRELV A SEQ ID NO: 107	VITSGGRIDYAD SVKG SEQ ID NO: 168	RFTISRDNAKNTVYL QMNSLKPEDTAVYY YNV SEQ ID NO: 127	ETVVGAVY SEQ ID NO: 188	WGQQGTQVTVSS SEQ ID NO: 131
147A01	EVQLVESGGGLVQ AGGSRLSCAAASG RMGN SEQ ID NO: 87	INAMG SEQ ID NO: 149	WYRQAPGKEREVL A SEQ ID NO: 108	KITRGGAITYAD SVKG SEQ ID NO: 169	RFTIARDNLNTAYLQ MNDLKPEDTAVYY NV SEQ ID NO: 128	DGGPSQNY SEQ ID NO: 189	WGQQGTQVTVSS SEQ ID NO: 131
144D01	EVQLVESGGGLVQ AGGSRLSCAAASG TIGT SEQ ID NO: 88	IRAMG SEQ ID NO: 150	WYRQAPGKQRELV A SEQ ID NO: 109	LITSTGRINYAD SVKG SEQ ID NO: 170	RFTIGRDNAKNTAYL QMNNLKPEDTAVYY YNI SEQ ID NO: 129	ETLRRNY SEQ ID NO: 190	WGQQGTQVTVSS SEQ ID NO: 131
054B12	EVQLVESGGGLVQ AGGSLTSCAVSG STFR SEQ ID NO: 89	INTMG SEQ ID NO: 151	WYRRAPGKQRELV A SEQ ID NO: 110	ARDRGGYINYY DSVKG SEQ ID NO: 171	RFTVSRDNAKPTMYL QMNSLKPEDTAVYY CHA SEQ ID NO: 130	GTQDRTGRNFDR SEQ ID NO: 191	WGQQGTQVTVSS SEQ ID NO: 131

21. Optimización de secuencia - Polipéptidos Antagonistas de CXCR2

Ensayo de cambio térmico (TSA): 5 microlitros del nanocuerpo monovalente purificado (80 miligramos/mlilitro) se mezclaron con 5 microlitros de la sonda fluorescente Sypro Orange (Invitrogen, Carlsbad, CA, catálogo # S6551) (concentración final 10x) en 10 microlitros de regulador (fosfato 100 mM, borato 100 mM, citrato 100 mM, NaCl 115 mM, regulado a diferentes pHs desde 3.5 hasta 9). Las muestras entonces se calentaron en una máquina LightCycler 480II (Roche, Basilea, Suiza), desde 37°C hasta 90°C a 4.4°C/segundo, después de lo cual, se enfriaron hasta 37°C a 2.2°C/segundo. Después del despliegue inducido por calor, los parches hidrofóbicos de las proteínas se exponen a lo que se enlaza el Sypro Orange, dando como resultado un aumento en la intensidad de fluorescencia. El punto de inflexión del primer derivado de la curva de intensidad de fluorescencia sirve como una medida de la temperatura de fusión (Tm). (Ericsson et al., 2006 (Annals of Biochemistry, 357: 289-298).

Calorimetría de exploración diferencial (DSC): Los experimentos se llevaron a cabo en un Auto-Cap VP-DSC (MicroCal – GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las determinaciones de la temperatura de fusión de los nanocuerpos (0.25 miligramos/mlilitro) se llevaron a cabo a una velocidad de calentamiento de 1°C/minuto sobre un intervalo de temperatura de 30°C a 95°C. Los termogramas finales se obtuvieron después de la sustracción apropiada de la línea basal. La detección de picos accionada por el software (Origin 7.0) proporcionó las temperaturas de fusión correspondientes.

Oxidación forzada: Las muestras de nanocuerpos (1 miligramo/mlilitro) se sometieron durante cuatro horas a temperatura ambiente y en la oscuridad, a H₂O₂ 10mM en suero regulado con fosfato (PBS), en paralelo con las muestras de control sin H₂O₂, seguido por el cambio de regulador hasta suero regulado con fosfato (PBS) utilizando columnas de centrifugación desaladoras Zeba (0.5 mlilitros) (Thermo Scientific). Entonces se analizaron las muestras estresadas y de control por medio de RPC en una máquina serie 1200 (Agilent Technologies) sobre una columna Zorbax 300SB-C3 (Agilent Technologies) a 70°C. La oxidación de los nanocuerpos se cuantificó mediante la determinación del porcentaje de área pico de los pre-picós que se presentaron como un resultado del estrés oxidativo, comparándose con el pico de la proteína principal.

2B2 Optimización de secuencia

La secuencia de proteína del 2B2 progenitor se alineó con las líneas germinales humanas VH3-23 (DP-47) y JH5 (Tabla 20, página 253). Las diferencias de aminoácidos en relación con la secuencia de la línea germinal humana están representadas por letras, y los aminoácidos idénticos por puntos. Las diferencias de aminoácidos que están subrayadas se seleccionaron para la conversión en la contraparte humana, mientras que los otros no se tocaron.

Se produjo el material monovalente purificado a partir de 2B2, CXCR20059 y CXCR20063, el cual entonces se caracterizó en un ensayo FACS de competición de ligando, y en un ensayo de liberación de calcio intracelular inducida por el agonista (FLIPR), tanto sobre el CXCR2 humano como de chinomolgo. En adición, se determinó la temperatura de fusión de las variantes en el ensayo de cambio térmico (TSA) o por medio de calorimetría de exploración diferencial (DSC) (Tabla 21). La mutación M93L en CXCR20059 y CXCR20063 elimina la sensibilidad del 2B2 progenitor a la oxidación forzada.

TABLA 21

Caracterización funcional del 2B2 monovalente, y variantes de secuencia optimizada

	Tm (°C)	FACS competición hGro-α IC ₅₀ (M)		FLIPR hGro-α IC ₅₀ (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
2B2	73.7	1.3 X 10 ⁻⁰⁹	3.5 X 10 ⁻⁰⁸	6.5 X 10 ⁻⁰⁷	2.4 X 10 ⁻⁰⁵
CXCR20059	73.4	1.5 X 10 ⁻⁰⁹	1.9 X 10 ⁻⁰⁸	3.9 X 10 ⁻⁰⁷	1.9 X 10 ⁻⁰⁵

	Tm (°C)	FACS competición hGro-α IC ₅₀ (M)		FLIPR hGro-α IC ₅₀ (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
CXCR20063	71.9	nd	5.4 X 10 ⁻⁰⁸	6.1 X 10 ⁻⁰⁶	2.4 X 10 ⁻⁰⁵

97A9 Optimización de secuencia

La secuencia de proteína del 97A9 progenitor se alineó con las líneas germinales humanas VH3-23 (DP-47) y JH5 (Tabla 22, página 254). Las diferencias de aminoácidos en relación con la secuencia de la línea germinal humana, están representadas por letras, y los aminoácidos idénticos por puntos. Las diferencias de aminoácidos que están subrayadas se seleccionaron para la conversión en la contraparte humana, mientras que los otros no se tocaron.

El material monovalente purificado se produjo a partir de 97A9 y CXCR20061, el cual se caracterizó en un ensayo de competición de ligando FACS y en un ensayo de liberación de calcio intracelular inducida por el agonista (FLIPR), tanto en CXCR2 humano como de chinomolgo. En adición, la temperatura de fusión de las variantes se determinó en el ensayo de cambio térmico (TSA) (Tabla 23).

TABLA 23

Caracterización funcional del 97A9 monovalente y variante de secuencia optimizada

	Tm (°C)	FACS competición hGro-α IC ₅₀ (M)		FLIPR hGro-α IC ₅₀ (M)	
ID		hCXCR2 ctrl	cCXCR2 ctrl	hCXCR2	cCXCR2
97A9	76.5	1.2 X 10 ⁻⁰⁸	6.3 X 10 ⁻⁰⁸	9.4 X 10 ⁻⁰⁸	8.0 X 10 ⁻⁰⁷
CXCR20061	80.2	1.5 X 10 ⁻⁰⁸	6.2 X 10 ⁻⁰⁸	6.6 X 10 ⁻⁰⁸	3.5 X 10 ⁻⁰⁷

163E3 Optimización de secuencia

La secuencia de proteína del 163E3 progenitor se alineó con las líneas germinales humanas VH3-23 (DP-47) y JH5 (Tabla 24, página 255). Las diferencias de aminoácidos en relación con la secuencia de la línea germinal humana están representadas por letras, y los aminoácidos idénticos por puntos. Las diferencias de aminoácidos que están subrayadas se seleccionaron para la conversión en la contraparte humana, mientras que los otros no se tocaron.

El material monovalente purificado se produjo a partir de 163E3 y CXCR20076, el cual entonces se caracterizó en un ensayo de competición de ligando FACS, y en un ensayo de liberación de calcio intracelular inducida por el agonista (FLIPR), tanto en CXCR2 humano como de chinomolgo. En adición, la temperatura de fusión de las variantes se determinó en el ensayo de cambio térmico (TSA) (Tabla 25).

TABLA 25

Caracterización funcional del 163E3 monovalente, y variante de secuencia optimizada

	Tm (°C)	FACS competición hGro-α IC ₅₀ (M)	FLIPR hGro-α IC ₅₀ (M)		
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
163E3	74.4	1.0 X 10 ⁻⁰⁸	2.2 X 10 ⁻⁰⁸	3.5 X 10 ⁻⁰⁸	1.5 X 10 ⁻⁰⁷
CXCR20076	77.3	1.6 X 10 ⁻⁰⁸	2.5 X 10 ⁻⁰⁸	3.1 X 10 ⁻⁰⁸	1.0 X 10 ⁻⁰⁷

127D1 Optimización de secuencia

- 5 La secuencia de proteína del 127D1 progenitor se alineó con las líneas germinales humanas VH3-23 (DP-47) y JH5 (Tabla 26, página 256). Las diferencias de aminoácidos en relación con la secuencia de la línea germinal humana están representadas por letras, y los aminoácidos idénticos por puntos. Las diferencias de aminoácidos que están subrayadas se seleccionaron para la conversión en la contraparte humana, mientras que los otros no se tocaron.
- 10 El material monovalente purificado se produjo a partir de 127D1 y CXCR20079, el cual entonces se caracterizó en un ensayo de competición de ligando FACS y un ensayo de liberación de calcio intracelular inducida por el agonista (FLIPR) tanto en CXCR2 humano como de chinomolgo. En adición, la temperatura de fusión de las variantes se determinó en el ensayo de cambio térmico (TSA) (Tabla 27). La mutación M57R en CXCR20079 elimina la sensibilidad del 127D1 progenitor a la oxidación forzada.

TABLA 27

15 Caracterización funcional del 127D1 monovalente y variante de secuencia optimizada

	Tm (°C)	FACS competición hGro-α IC ₅₀ (M)	FLIPR hGro-α IC ₅₀ (M)		
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
127D1	67.2	5.5 X 10 ⁻¹⁰	6.1 X 10 ⁻⁰⁹	1.5 X 10 ⁻⁰⁸	1.1 X 10 ⁻⁰⁶
CXCR20079	68.6	8.0 X 10 ⁻¹⁰	2.8 X 10 ⁻⁰⁹	1.0 X 10 ⁻⁰⁸	4.5 X 10 ⁻⁰⁷

163D2 Optimización de secuencia

- La secuencia de proteína del 163D2 progenitor se alineó con las líneas germinales humanas VH3-23 (DP-47) y JH5 (Tabla 28, página 257). Las diferencias de aminoácidos en relación con la secuencia de la línea germinal humana están representadas por letras, y los aminoácidos idénticos por puntos. Las diferencias de aminoácidos que están subrayadas se seleccionaron para la conversión en la contraparte humana, mientras que los otros no se tocaron.

El material monovalente purificado se produjo a partir de 163D2 y CXCR20086, el cual entonces se caracterizó en un ensayo de competición de ligando FACS y un ensayo de liberación de calcio intracelular inducida por el agonista (FLIPR) tanto en CXCR2 humano como de chinomolgo. En adición, la temperatura de fusión de las variantes se determinó en el ensayo de cambio térmico (TSA) (Tabla 29).

TABLA 29

Caracterización funcional del 163D2 monovalente y variante de secuencia optimizada

	Tm (°C)	FACS competición hGro-α IC ₅₀ (M)		FLIPR hGro-α IC ₅₀ (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
163D2	70.7	2.8 X 10 ⁻⁰⁹	7.1 X 10 ⁻⁰⁹	6.6 X 10 ⁻⁰⁸	9.2 X 10 ⁻⁰⁸
CXCR20086	72.3	2.0 X 10 ⁻⁰⁹	4.8 X 10 ⁻⁰⁹	7.3 X 10 ⁻⁰⁸	8.5 X 10 ⁻⁰⁸

54B12 Optimización de secuencia

- 5 La secuencia de proteína del 54B12 progenitor se alineó con las líneas germinales humanas VH3-23 (DP-47) y JH5 (Tabla 30, página 258). Las diferencias de aminoácidos en relación con la secuencia de la línea germinal humana están representadas por letras, y los aminoácidos idénticos por puntos. Las diferencias de aminoácidos que están subrayadas se seleccionaron para la conversión en la contraparte humana, mientras que los otros no se tocaron.
- 10 El material monovalente purificado se produjo a partir de 54B12, CXCR20103 y CXCR2104, el cual entonces se caracterizó en un ensayo de competición de ligando FACS y un ensayo de liberación de calcio intracelular inducida por el agonista (FLIPR) tanto en CXCR2 humano como de chinomolgo. En adición, la temperatura de fusión de las variantes se determinó en el ensayo de cambio térmico (TSA) (Tabla 31).

TABLA 31

Caracterización funcional del 54B12 monovalente, y la variante de secuencia optimizada

	Tm (°C)	FACS competición hGro-α IC ₅₀ (M)		FLIPR hGro-α IC ₅₀ (M)	
ID		hCXCR2 ctrl	cCXCR2 ctrl	hCXCR2	cCXCR2
54B12	64.4	nf*	3.3 X 10 ⁻⁰⁸	1.5 X 10 ⁻⁰⁷	1.1 X 10 ⁻⁰⁶
CXCR20104	tbd	nf*	1.3 X 10 ⁻⁰⁸	5.9 X 10 ⁻⁸	3.5 X 10 ⁻⁶

TABLA 20 Alineación de 2B2 y variantes de secuencia optimizada

Kabat#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	101	110
VH3-23-JH5	EVQLESGEGLNQPGGSFLSCASGFTSYAMSIVRQAPGLENVRSATSGGGTYAKLNSKRTIDSVKGRFTIQLQNSRLRMTAVYCAK...										
CXCR2AB#2	...V...E...	SILTIN..G.Y.	QR.L..VERT-R..T.Q.			A.I.K.M.	KEP...	MILDREGVY...Q...			
CXCR20059	SILTIN..G.Y.	QR.L..VERT-R..T.Q.			A.I.K.M.	P...	MILDREGVY...			
CXCR20063	SILTIN..G.Y.	QR.L..VERT-R..T.Q.			A.I.M.	P...	MILDREGVY...			

TABLA 22 - Alineación de 97A9 y variante de secuencia optimizada

Kabab #	VII-23-JH5	CXCR3/TIA9	CXCR3/TIA1
10	EVOLUESEGGLQPGCSLFLSCASGTESEVANSTWYRQAPKGIGSSESTYADSVKGRFLSDNSSENTLYQLQNSLSAEDTAVTCAR	EVOLUESEGGLQPGCSLFLSCASGTESEVANSTWYRQAPKGIGSSESTYADSVKGRFLSDNSSENTLYQLQNSLSAEDTAVTCAR	EVOLUESEGGLQPGCSLFLSCASGTESEVANSTWYRQAPKGIGSSESTYADSVKGRFLSDNSSENTLYQLQNSLSAEDTAVTCAR
20	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.
30	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.
40	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.
50	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.
60	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.
70	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.
80	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.
90	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.
100	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.
110	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.	...V...SIVRINT...G.Y...T...OR.LAD.T...NIN.LA.

TABLA 24 - Alineación de 163E3 y variante de secuencia optimizada

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
Rabat#	:
VH3-23/JH5	:	EVQLESGGGVQPSSSLSCASGFPSYYMSWQAPGKLENVATSG-SGSGTYYAADSYKGRTISRDUNSENLYLQMNISTRAEDTAVYYCAR-----									
CXCR2163P3	:
CXCR20076	:

ES 2 687 654 T3

TABLA 26 - Alineación de 127D1 y variante de secuencia optimizada

ES 2 687 654 T3

TABLA 28 - Alineación de 163D2 y variante de secuencia optimizada

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
Kabat#	a.....	abc.....	abcd ^e f ^g
VH3-23/JH5	EVQLLESGGGLVQPGCSRLSCAASGFTFSSYAMSWRQAPGKLEWWSAISGGGTTYADSVKGRFTISRDNISKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAK	WGQGTLTVSS
CXCR2163D2V.....A.....R.....D.....G.F.....ER.F.A..TWN..RVF.TA.....A.....M.....KP.....	ADKDRRTDYLGHPVAY.....Q.....
CXCR20086V.....A.....R.....D.....G.F.....ER.F.A..TWN..RVF.TA.....A.....M.....KP.....	ADKDRRTDYLGHPVAY.....P.....

TABLA 30 - Alineación de 54B12 y variantes de secuencia optimizada

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
Kabat#	a.....	abc.....	abcd.....
VH3-23/JH5	EVQLLESGGGLVQPGGSRLSCAASGFTFSSYAMSWRQAPGKLEWWSAISGGGTTYADSVKGRFTISRDNISKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAK	WGQGTLTVSS
CXCR254B12V.....A.....T.....V.....S.....RINT.G.Y.....QR.L.A.RD-R.....YIN.V.....V.....A.....P.M.....KP.....	HAGIQDRTRGNFDR.....Q.....
CXCR20103V.....A.....T.....V.....S.....RINT.G.Y.....QR.L.A.RD-R.....YIN.V.....V.....A.....P.M.....P.....	HAGIQDRTRGNFDR.....P.....
CXCR20104V.....A.....T.....V.....S.....RINT.G.Y.....QR.L.A.RD-R.....YIN.V.....V.....A.....P.M.....P.....	HAGIQDRTRGNFDR.....P.....

TABLA 32

Secuencias de aminoácidos de variantes de secuencia optimizada

CXCR 20059	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQRELVVR RTRGGSTTYQDSVKGRFTISADISKKTMYLQMNSLRPEDTAVYYCLLDDRG GVYWGQQGTLTVSS	SEQ ID NO: 213
CXCR 20063	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQRELVVR RTRGGSTTYQDSVKGRFTISADISKNTMYLQMNSLRPEDTAVYYCLLDDRG GVYWGQQGTLTVSS	SEQ ID NO: 214
CXCR 20061	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIVRINTMGWYRQAPGKQRELVADI TSGGNINYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEIVLV GVWTQRARTGNYWGQQGTLTVSS	SEQ ID NO: 215
CXCR 20079	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDFKVMGWYRQAPGKQREGVA AIRLSGNRHAYAESVKGRFTISRANSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIR GQDYWGQQGTLTVSS	SEQ ID NO: 216
CXCR 20076	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAA ITWRSIGSAYYADSVKGRFTISRDNNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAG GSSWLSFPPDYWGQQGTLTVSS	SEQ ID NO: 217
CXCR 20086	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVA AITWNGGRVFYTASVKGRFTISRDNNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADK DRRTDYLGHPVAYWGQQGTLTVSS	SEQ ID NO: 218
CXCR 20104	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSTFRINTMGWYRQAPGKQRELVAA RDRGGYINYVDSVKGRFTISRDNSKPTMYLQMNSLRPEDTAVYYCHAGTQ DRTGRNFDRWGQQGTLTVSS	SEQ ID NO: 219

TABLA 33

Secuencias de aminoácidos de biparatópicos de secuencia optimizada (incluyendo HLE con Alb8):

CXCR20079-35GS-CXCR20076	SEQ ID NO: 221	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDKVMGWYRQAPGKQ REGVAIRLSGNRHYAESVKGRFTISRANSKNTVYLQMNSLRPEDT AVYYCKVNIRGQDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGGSGGGGG GSGGGGSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG RIFSSNAMGWFRQAPGKEREVAAITWRSGGSAYYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQQ TLTVSS
CXCR20079-35GS-CXCR20086	SEQ ID NO: 222	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDKVMGWYRQAPGKQ REGVAIRLSGNRHYAESVKGRFTISRANSKNTVYLQMNSLRPEDT AVYYCKVNIRGQDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGGSGGGGG GSGGGGSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG REFVAAITWNNGRVFYTASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPED TAVYYCAADKDRRTDYLGH PVAYWGQGTLTVSS
CXCR20104-35GS-CXCR20076	SEQ ID NO: 223	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSTFRINTMGWYRQAPGKQ RELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTISRDN SKPTMYLQMNSLRPEDT AVYYCHAGTQDRTGRNFDRWGQGTLTVSSGGGGSGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG RIFSSNAMGWFRQAPGKEREVAAITWRSGGSAYYADSVKGRFTI SRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPP DYWGQGTLTVSS
CXCR20104-35GS-CXCR20086	SEQ ID NO: 224	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSTFRINTMGWYRQAPGKQ RELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTISRDN SKPTMYLQMNSLRPEDT AVYYCHAGTQDRTGRNFDRWGQGTLTVSSGGGGSGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG RFTFS DYAMGWFRQAPGKEREVAAITWNNGRVFYTASVKGRFTI SRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGH PVAYWGQGTLTVSS

CXCR20079-35GS-CXCR20076-35GS-Alb8	SEQ ID NO: 225	EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGSTDFKVMGWYRQAPGKQ REGVAIRLSGNRHYAESVKGRFTISRANSKNTVYLQMNSLRPEDT AVYYCKVNIRGQDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGGGGGGGG GS GG GGGGGGGGGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG RIFSSNAMGWFRQAPGKEREFAITWRSGGSAYYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQG TLTVSSGGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG SEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGK GLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPE DTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
CXCR20079-35GS-CXCR20061-35GS-Alb8	SEQ ID NO: 226	EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGSIVRINTMGWYRQAPGKQR ELVADITSGGNINYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAV YYCNAEIVVLGVWTVQARTGNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG SG GG GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGN SLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYA DSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQ GTLVTVSS
CXCR20079-35GS-CXCR20086-35GS-Alb8	SEQ ID NO: 227	EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGSTDFKVMGWYRQAPGKQ REGVAIRLSGNRHYAESVKGRFTISRANSKNTVYLQMNSLRPEDT AVYYCKVNIRGQDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGGGGGGGG GS GG GGGGGGGGGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG REFVAIAITWNNGRVFYTASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPED TAVYYCAADKDRRTDYLGH PVAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG SG GG GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGN SLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYA DSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQ GTLVTVSS
ALB8	SEQ ID NO: 228	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKG LEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPED TAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS

TABLA 34
Secuencias de aminoácidos de variantes de secuencia optimizada, y progenitores que incluyen anotaciones de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) (Kabat), y de las regiones de estructura (FRs):

	Estructura 1	CDR1	Estructura 2	CDR2	Estructura 3	CDR3	Estructura 4
CXCR 20059	EVQLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGSILT SEQ ID NO: 229	INAMG SEQ ID NO: 147	WYRQAPGKQRELWV SEQ ID NO: 106	RRTTRGGSTT YQDSVKG SEQ ID NO: 167	RFTISADISKNTMYLQMN SLRPEDTAVYYCLL SEQ ID NO: 238	DDRGGVY SEQ ID NO: 187	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO: 245
CXCR 20063	EVQLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGSILT SEQ ID NO: 229	INAMG SEQ ID NO: 147	WYRQAPGKQRELWV SEQ ID NO: 106	RRTTRGGSTT YQDSVKG SEQ ID NO: 167	RFTISADISKNTMYLQMN SLRPEDTAVYYCLL SEQ ID NO: 239	DDRGGVY SEQ ID NO: 187	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO: 245
002 B02	EVQLVESGGELVQPGG SLRLSCAASGSILT SEQ ID NO: 85	INAMG SEQ ID NO: 147	WYRQAPGKQRELWV SEQ ID NO: 106	RRTTRGGSTT YQDSVKG SEQ ID NO: 167	RFTISADIAKKTMYLQMN SLKPEDTAVYYCML SEQ ID NO: 126	DDRGGVY SEQ ID NO: 187	WGQGTVTVSS SEQ ID NO: 131
CXCR 20061	EVQLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGSIVR SEQ ID NO: 230	INTMG SEQ ID NO: 143	WYRQAPGKQRELVA SEQ ID NO: 234	DITSGGNINY ADSVKG SEQ ID NO: 235	RFTISRDNSKNTVYLQM NSLRPEDTAVYYCNA SEQ ID NO: 240	EIVLVGVWTQ RARTGNY SEQ ID NO: 183	WGQGTVWTQ WGQGTLVTVSS SEQ ID NO: 245
097 A09	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCVAVASGSIVR	INTMG SEQ ID NO:	WYRQTPGKQRELVA SEQ ID NO: 102	DITSGGNINY IDAVKG SEQ ID NO:	RFTISRDNTKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCNA	EIVLVGVWTQ RARTGNY SEQ ID NO: 133	WGQGTVWTQ WGQGTVTVSS SEQ ID NO: 133

	Estructura 1	CDR1	Estructura 2	CDR2	Estructura 3	CDR3	Estructura 4
	SEQ ID NO: 81.	143		163	SEQ ID NO: 122	SEQ ID NO: 183	
CXCR 20079	EVQLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGRIFSD	FKV/MG SEQ ID NO: 141	WYRQAPGKQREGVA SEQ ID NO: 235	AIRLSGNRH YAESV/KG SEQ ID NO: 236	RFTISRANSKNTVYLQM NSLRPEDTAVYYCKV SEQ ID NO: 241	NIRGQDY SEQ ID NO: 181	WGQGTIVTVSS SEQ ID NO: 245
127 D01	EVQLVESGGGLVQAGE SLRLSCAASGRIFSD	FKV/MG SEQ ID NO: 141	WYRQPQPGKQREGVA SEQ ID NO: 100	AIRLSGNMH YAESV/KG SEQ ID NO: 161	RFTISKANAKNTVYLQM NSLRPEDTAVYYCKV SEQ ID NO: 120	NIRGQDY SEQ ID NO: 181	WGQGTIVTVSS SEQ ID NO: 131
CXCR 20076	EVQLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGRIFSD	SNAMG SEQ ID NO: 146	WFRQAPGKEREFA SEQ ID NO: 105	AITWRSGGS AYYADSV/KG SEQ ID NO: 237	RFTISRDNSKNTVYLQM NSLRPEDTAVYYCAA SEQ ID NO: 242	GGSSWLSFPPD Y SEQ ID NO: 186	WGQGTIVTVSS SEQ ID NO: 245
163 E03	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCVVASGRIFSD	SNAMG SEQ ID NO: 146	WFRQAPGKEREFA SEQ ID NO: 105	AITWRSGGS AYYADSAKG SEQ ID NO: 166	RFTISRDNAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAA SEQ ID NO: 125	GGSSWLSFPPD Y SEQ ID NO: 186	WGQGTIVTVSS SEQ ID NO: 131

	Estructura 1	CDR1	Estructura 2	CDR2	Estructura 3	CDR3	Estructura 4
CXCR 20086	EVQLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGRTFS SEQ ID NO: 233	DYAMG SEQ ID NO: 145	WFRQAPGKEREFAVA SEQ ID NO: 104	AITWNGGRV FYTASVK SEQ ID NO: 165	RFTISRDNSKNTLYLQM NSLRPEDTAVYYCAA SEQ ID NO: 243	DKDRRTDYLGH PVAY SEQ ID NO: 185	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO: 245
163 D02	EVQLVESGGGLVQAGG SLRLSCAASGRTFS SEQ ID NO: 83	DYAMG SEQ ID NO: 145	WFRQAPGKEREFAVA SEQ ID NO: 104	AITWNGGRV FYTASVK SEQ ID NO: 165	RFTISRDNAKNTMYLQM NSLKPEDTAVYYCAA SEQ ID NO: 124	DKDRRTDYLGH PVAY SEQ ID NO: 185	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO: 131
CXCR 20104	EVQLESGGGLVQPGG SLRLSCAVSGSTFR SEQ ID NO: 234	INTMG SEQ ID NO: 151	WYRQAPGKQRELVA SEQ ID NO: 234	ARDRGGYIN YVDSVK SEQ ID NO: 171	RFTISRDNSKPTMYLQM NSLRPEDTAVYYCHA SEQ ID NO: 244	GTQDRTGRNFD R SEQ ID NO: 191	WGQGTLVTVSS SEQ ID NO: 245
054 B12	EVQLVESGGGLVQAGG SLTLSCAVSGSTFR SEQ ID NO: 89	INTMG SEQ ID NO: 151	WYRRAPGKQRELVA SEQ ID NO: 110	ARDRGGYIN YVDSVK SEQ ID NO: 171	RFTVSRDNAKPTMYLQM NSLKPEDTAVYYCHA SEQ ID NO: 130	GTQDRTGRNFD R SEQ ID NO: 191	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO: 131

TABLA 35

Anotaciones de CDR de Chotia de variantes de secuencia optimizada

	HCDR1	HCDR2	HCDR3
CXCR20059	GSILTIN	TRGGS	DDRGGVY
CXCR20063	GSILTIN	TRGGS	DDRGGVY
CXCR20061	GSIVRIN	TSGGN	EIVVLVGVWTQRARTGNY
CXCR20079	GSTFDFK	RLSGN	NIRGQDY
CXCR20076	GRIFSSN	TWRSGGS	GGSSWLSFPPDY
CXCR20086	GRTFSDY	TWNNGGR	DKDRRTDYLGHPVAY
CXCR20104	GSTFRIN	DRGGY	GTQDRTGRNFDR

22. Mapeo de Epítopos

- 5 El mapeo de epítopos de los nanocuerpos fue llevado a cabo por Integral Molecular Inc., 3711 Market street, Suite 900, Filadelfia, PA, EUA, www.integralmolecular.com utilizando su Tecnología de Mutagénesis de Disparo (Shotgun Mutagenesis Technology).

Compendio de la Tecnología de Mutagénesis de Disparo

- 10 La Mutagénesis de Disparo utiliza una tecnología de expresión celular de alta producción registrada, que hace posible la expresión y el análisis de grandes bibliotecas de proteínas objetivo mutadas dentro de las células eucarióticas. Cada residuo de una proteína se muta individualmente, por lo regular hasta otros múltiples aminoácidos, con el objeto de ensayar los cambios en la función. Las proteínas se expresan dentro de las líneas celulares de mamífero convencionales, de modo que se pueden mapear incluso las proteínas difíciles que requieran de procesamiento eucariótico en la traducción y después de la traducción.

- 15 La nomenclatura para el mapeo de epítopos es como sigue:

RDHBC 792 = CXCR20079

RDHBC 793 = CXCR20061

RDHBC 792 = CXCR20076

- 20 Los epítopos de los anticuerpos anti-CXCR2: RD-HBC792 (CXCR20079), RD-HBC793 (CXCR20061), y RD-HBC794 (CXCR20076) se mapearon en una resolución de un solo aminoácido utilizando la mutagénesis de disparo como sigue.

- Construcción progenitora: El gen progenitor no marcado se clonó en un vector de alta expresión, se secuenció, y se validó para la expresión mediante inmunodetección. Optimización del nanocuerpo: La detección de los nanocuerpos se optimizó en el formato de Mutagénesis de Disparo, ensayando un panel de diluciones de nanocuerpos en microplacas de 394 pozos. Se seleccionó una concentración óptima de cada nanocuerpo para el rastreo de la biblioteca de mutaciones. 25 La biblioteca de mutaciones se completó, y cada posición de aminoácido se mutó hasta un cambio conservado y no conservado, incluyendo la mutación de cada residuo hasta una sustitución con Ala. La biblioteca se probó para

determinar la expresión superficial y se rastreó, por triplicado, para determinar el enlace del nanocuerpo mediante inmunodetección. Se llevó a cabo el análisis de la biblioteca para determinar la pérdida de enlace del nanocuerpo, y los residuos críticos se identificaron y se mapearon.

- 5 Expresión de la construcción progenitora: Se llevó a cabo la inmunodetección de la construcción progenitora de tipo silvestre transitoriamente expresada en un formato de 384 pozos, mediante inmunoluminiscencia e inmunofluorescencia. Para todos los experimentos, los pasos de manejo de líquidos involucrados en la transfección de las células y en el inmunoteñido, se llevaron a cabo utilizando robots de manejo de líquidos, con el fin de asegurar la precisión y una alta reproducibilidad experimental.

TABLA 36

10 Parámetros experimentales empleados para probar el plásmido progenitor

Parámetro Experimental	Inmuno-luminiscencia	Inmuno-fluorescencia
Células	HEK-293T	HEK-293T
Fijador	PFA al 4%	PFA al 4%
Regulador de Bloqueo	Suero de cabra al 10%	Suero de cabra al 10%
Conc. Objetivo 1a. Incubación MAb Catálogo del Fabricante #	α -CXCR2 2 μ g/mL 1 hora R&D Systems MAB331	α -CXCR2 3 μ g/millilitro 1 hora R&D Systems MAB331
Conc. Objetivo 2o. MAb Catálogo del Fabricante #	HRP de ratón- α , 0.8 μ g/mL Jackson Immunoresearch 115-035-003	Dyelight de ratón α , 549 3.75 μ g/mL Jackson Immunoresearch 115-505-003
Lavados	PBS++	PBS++
Señal:Fondo	29:1	2.2:1
% CV del Progenitor	4.7 %	12 %

TABLA 37

Parámetros experimentales empleados para la inmunodetección policlonal

Detección de la expresión total en la superficie celular del receptor, utilizando suero polyclonal. El suero polyclonal (capaz de reaccionar con todos los mutantes) se utiliza para cuantificar la expresión total, de modo que se pueda detectar cada clón en la biblioteca de mutaciones. Parámetro Experimental	Inmunodetección Polyclonal
Células	HEK-293T

Fijador	PFA al 4 %
Regulador de Bloqueo	Suero de cabra al 10%
Incubación de Conc. Objetivo de 1er. PAb, Catálogo del Fabricante #	Dilución de α -CXCR2 1:1,000, 1 hora, Novus NBP1-49218
Conc. de 2o. MAb Objetivo Catálogo del Fabricante #	HRP de conejo- α , 0.8 μ g/mL, Southern Biotech 4050-05
Lavados	PBS++
Señal:Fondo	17:1
% CV	10 %

Conclusión: Se detecta una expresión superficial robusta y la expresión total para la construcción progenitora de tipo silvestre, utilizando un MAb de control y un suero policlonal, de tal manera que la construcción progenitora de tipo silvestre se puede utilizar para la Mutagénesis de Disparo. El ensayo de inmunoluminiscencia muestra una alta proporción de la señal:fondo y una baja variabilidad, y se utilizará para los estudios de mapeo.

5

La inmunodetección se optimizó utilizando el mapeo de los nanocuerpos. La inmunodetección se hizo en un formato de 384 pozos, utilizando células transitoriamente transfectadas con el receptor de tipo silvestre o con el vector sólo plásmido. Las concentraciones seleccionadas para los estudios de mapeo adicionales se basaron en una señal casi máxima con una alta proporción de la señal:fondo, y con una baja variabilidad.

10 Condiciones Finales del Ensayo para el Rastreo de la Biblioteca de Mutaciones

15 TABLA 38. Parámetros experimentales empleados para la detección en el ensayo optimizado en el formato de Mutagénesis de Disparo de 384 pozos. Se utilizaron las condiciones de ensayo optimizadas definidas en la presente para el mapeo de la biblioteca de mutaciones de CXCR2 en un formato de 384 pozos. Cada clon de la biblioteca se expresó en las células mediante transfección transitoria, y se ensayó para determinar la reactividad del nanocuerpo aproximadamente 18 horas después de la transfección. Los nanocuerpos CXCR2 RD-HBC792, RD-HBC793 y RD-HBC794 carecen de regiones Fcs pero contienen una marca myc, de modo que se empleó una estrategia de detección de múltiples pasos, en donde se utilizó un anticuerpo anti-myc de ratón intermedio (9E10), seguido por la detección con un anticuerpo de HRP anti-ratón.

Parámetro Experimental	RD-HBC792	RD-HBC793	RD-HBC794
------------------------	-----------	-----------	-----------

ES 2 687 654 T3

Parámetro Experimental	RD-HBC792	RD-HBC793	RD-HBC794
Células	HEK-293T	HEK-293T	HEK-293T
Fijador	PFA al 4%	PFA al 4%	PFA al 4%
Regulador de bloqueo	suero de cabra al 10%	suero de cabra al 10%	suero de cabra al 10%
1er. MAb			
Objetivo	α-CXCR2	α-CXCR2	α-CXCR2
Conc. Óptima	1.0 µg/ml	1.0 µg/ml	2.0 µg/ml
Incubación	1 hora	1 hora	1 hora
2o. MAb			
Incubación de Conc. Objetivo	α-myc 2 µg/ml, 1 hora	α-myc 2 µg/ml 1 hora	α-myc 2 µg/ml 1 hora
Fabricante Nombre del Anticuerpo	interno hibridoma 9E10	interno hibridoma 9E10	interno hibridoma 9E10
3er. MAb			
Objetivo	HRP de ratón-α	HRP de ratón-α	HRP de ratón-α
Conc. Fabricante	0.8 µg/ml Jackson	0.8 µg/ml Jackson	0.8 µg/ml Jackson
Catálogo #	Immuno-research	Immuno-research	Immuno-research
	115-035-003	115-035-003	115-035-003
Lavados	PBS++	PBS++	PBS++

Parámetro Experimental	RD-HBC792	RD-HBC793	RD-HBC794
Señal:Fondo	13:1	6.9:1	20:1
% de CV	7.9 %	22 %	13 %

5 Conclusión: Se determinaron las condiciones finales para la inmunodetección y el mapeo de epítopos de 3 nanocuerpos CXCR2. Las condiciones optimizadas dieron como resultado una alta proporción de la señal:fondo, y una baja variabilidad en el formato de mutagénesis de disparo y, por consiguiente, no se pudieron utilizar para el mapeo de epítopos con un alto nivel de confianza. El mapeo de los epítopos involucró la aplicación de las mismas condiciones de ensayo determinadas en la presente, pero con una biblioteca de mutaciones de variantes del receptor.

Identificación de Residuos Críticos para los Epítopos del Nanocuerpo

10 TABLA 39. Identificación de residuos críticos. Se identificaron los residuos críticos para el MAb mediante una comparación de las reactividades de los nanocuerpos de los clones, contra la reactividad polyclonal (expresión superficial). Los residuos involucrados en el epítopo del anticuerpo se identificaron como aquéllos que fueron negativos para el enlace del nanocuerpo pero positivos para el enlace polyclonal, e incluyeron una sustitución del residuo Ala (es decir, la remoción de la cadena lateral del residuo), y se localizaron en los ciclos extracelulares. Se muestran las reactividades promedio y la desviación estándar para el enlace del MAb y el enlace del anticuerpo polyclonal. Los 15 residuos críticos identificados para cada MAb están sombreados en gris. Los datos para el RD HBC792 también se compararon con los del RD HBC793, debido a que se encontró que el perfil de enlace para el RD HBC792 era similar al del suero polyclonal comercial (el cual se derivó a partir del dominio extracelular N-terminal del CXCR2 humano, explicando probablemente la más baja reactividad del suero contra las mutaciones F11, F14, y W15).

ID Residuo	Mutaciones	ID Clon	Polyclonal		RD HBC 792		RD HBC 793		RD HBC 792	
11	F11A	10	39.9	17.0	7.1	2.1	81.1	13.7	81.6	20.6
	F11Y	975	70.5	6.2	26.7	14.7	113.9	5.4	100.2	29.1
14	F14A	486	35.4	5.4	9.4	3.9	98.6	8.7	110.3	5.5
	F14Y	1170	100.2	16.7	53.0	10.0	117.7	46.6	124.9	4.6
15	W15A	116	69.2	2.8	6.4	1.4	125.4	18.6	114.5	13.1
	W15Y	1075	92.3	6.2	14.9	6.4	112.2	27.9	110.8	11.4
39	C39A	95	86.2	6.0	65.0	6.7	7.6	7.1	10.1	0.7
	C39N	1099	108.7	8.8	94.4	34.9	4.7	6.7	9.2	4.4

ES 2 687 654 T3

ID Residuo	Mutaciones	ID Clon	Policlonal		RD HBC 792		RD HBC 792		RD HBC 792	
112	W112A	318	88.2	12.9	102.8	28.7	15.5	7.4	25.4	6.6
	W112Y	1462	109.9	13.6	106.1	25.1	37.1	6.2	39.9	16.1
114	F114A	211	88.9	5.8	73.1	10.6	26.3	8.4	33.4	10.2
	F114Y	1560	122.3	14.6	87.4	21.0	102.2	25.4	116.8	37.2
115	G115A	320	82.7	7.7	70.4	14.1	13.2	5.2	18.3	2.2
	G115T	1561	82.4	40.6	89.7	9.8	61.7	14.8	55.6	6.6
188	Y188A	765	89.6	21.2	100.0	37.7	102.8	12.4	20.1	6.3
	Y188F	1634	133.8	16.2	106.8	14.2	87.1	31.1	107.2	11.7
196	C196A	963	86.9	16.4	99.9	17.2	1.2	7.0	8.8	2.4
	C196N	1836	97.9	8.1	90.9	14.3	7.3	2.1	9.3	3.3
274	D274A	889	101.4	14.9	102.2	1.9	21.4	7.0	29.4	9.2
	D274E	1955	80.3	20.3	97.5	6.6	52.1	13.2	60.4	14.3
282	I282A	669	79.6	10.7	66.8	17.7	25.5	12.2	24.6	8.8
	I282N	1989	58.8	9.2	78.5	13.7	6.9	18.0	10.3	3.1
285	T285A	770	64.8	14.3	53.1	2.4	17.1	9.7	28.8	13.6
	T285S	2215	154.4	65.9	91.8	23.2	116.4	37.0	121.5	27.0
286	C286A	771	87.3	19.6	57.4	9.6	5.6	6.5	6.2	2.0
	C286N	2024	92.0	20.9	58.0	13.5	1.3	9.3	11.7	8.2

ID Residuo	Mutaciones	ID Clon	Policlonal		RD HBC 792		RD HBC 792		RD HBC 792	
293	D293A D293E	778 2127	131.5 150.3	4.9 23.4	100.8 138.9	49.9 24.6	15.9 73.3	8.2 26.5	44.9 141.9	17.6 19.4

Análisis adicional de la información del epítopo

Los aminoácidos críticos identificados mediante el Mapeo de Mutagénesis de Disparo (Shotgun Mutagenesis Mapping) definen los sitios de enlace para los 3 MAbs del CXCR2. El MAb RD HBC792 se mapea en la región N-terminal del CXCR2, y la estrecha proximidad de los residuos críticos sugiere que el epítopo es lineal en la naturaleza. Los MAbs RD HBC793 y RD HBC794 parecen enlazarse al epítopo conformacionalmente complejo formado primordialmente por ECL1 y ECL3 del CXCR2. La mutación de los residuos Cys extracelulares, que se sabe que forman dos puentes de disulfuro que mantienen los ciclos extracelulares en su lugar en los receptores de quimiocina, también elimina el enlace de los MAbs 793 y 794, de modo que no se cree que estén directamente involucrados en la interacción del epítopo. Los epítopos de 793 y 794 se traslanan de una manera significativa, aunque son evidentes las sutiles diferencias entre los dos.

23. Selectividad de CXCR2 en líneas celulares recombinantes.

Liberación de calcio intracelular inducida por el agonista (FLIPR)

Con el fin de verificar la selectividad de CXCR2, los diferentes monovalente nanocuerpos anti-CXCR2 se combinaron ya sea como construcciones mono-valentes, bivalentes o biparatópicas, en donde los bloques de construcción de los nanocuerpos individuales son separados por un enlazador 35GS.

Las células RBL que expresaban el receptor CXCR2 humano se cargaron con tinte Fluo-4 durante 30 minutos a 37°C, seguidos por 30 minutos de incubación con los nanocuerpos monovalentes, bivalentes o biparatópicos purificados. Finalmente, se llevó a cabo la adición de GROα utilizando un lector de placas de imágenes fluorométricas (FLIPR), seguido por la detección de una señal fluorescente, Correspondiente a la liberación de calcio intracelular. Se llevó a cabo un ensayo de selectividad utilizando células L2071 que expresaban el CXCR1 humano. El protocolo de ensayo siguió siendo el mismo que se describió para el CXCR2; sin embargo, se utilizó la IL-8 como el agonista. En la Figura 3 se muestra un resultado representativo.

24. Prolongación de la vida media con anti-HSA (Alb8)

Los neutrófilos son una de las células pro-inflamatorias principales en la inflamación, que expresan altos niveles de Receptores CXCR2, los cuales median la quimioatracción. Se puede cuantificar el cambio de forma del neutrófilo después de la estimulación con un ligando de CXCR2 (GROα) o de los estímulos de control (FMLP) mediante citometría de flujo, y se utiliza como un marcador de activación.

En este estudio, los nanocuerpos anti-CXCR2 se perfilaron *in vivo* para determinar las características farmacodinámicas del nanocuerpo con una vida media prolongada (HLE: CXCR20076-35GS-CXCR20079-Alb8 (también referido como 76-79-Alb8 en los Ejemplos) comparándose con NB-NB (sin HLE: CXCR20076-35GS-CXCR20079 (también referido como 76-79 en los Ejemplos)). Se inyectaron intravenosamente nanocuerpos en una sola dosis a monos cinomolgos en dosis equimolares: nanocuerpo no formateado (NB-NB, 0.3 miligramos/kilogramo) o nanocuerpo extendido por el dominio Alb8 (anti-HSA) (NB-NB-Alb8, 0.45 miligramos/kilogramo), se recolectó la sangre antes de la dosis, y en diversos puntos del tiempo después de la dosis hasta 35 días. Todas las construcciones inhibieron completamente el cambio de forma de los neutrófilos de sangre entera (WBSC) *ex vivo* en el primer punto del tiempo del muestreo (1 hora o 3 horas después de la inyección). Una fuerte inhibición farmacodinámica (PD) (WBSC) evidente con una duración más larga de 9 días para la fusión de NB-NB-Alb8 se comparó con 30 horas para el nanocuerpo NB-NB sin HLE.

25. Los nanocuerpos 79-76-Alb8 y 79-86-Alb8 bloquean completamente la actividad funcional de CXCR2

NVP	IC ₅₀ (nM) para GROα			
	CHO-hCXCR2 GTPγS	hSCA aislado	hWBSCA	NHP WBSC
	Promedio + SD N = 3	Promedio + SEM N = 3	Promedio + SEM N = 6-12	Promedio + SEM N = 4
(79-76-Alb8)	2.86 + 0.11	0.26 + 0.04	0.11 + 0.00	0.76 + 0.25
(79-86-Alb8)	2.03 (n=1)	0.16 + 0.01	0.11 + 0.	0.6 + 0.5 (SD n =3)

Los nanocuerpos 79-76-Alb8-AA y 79-86-Alb8-AA son funcionalmente equivalentes y bloquean completamente la función del CXCR2. Los anticuerpos, por consiguiente, no son alterados por la adición de las variantes de Ala-Ala en el término C.

5

NVP	IC ₅₀ (nM) para GROα			
	CHO-hCXCR2 GTPγS	hSCA aislado	hWBSCA	NHP WBSC
	Promedio + SD N = 3	Promedio + SD N = 3	Promedio + SEM N = 6-8	Promedio + SEM N = 4
(79-76-Alb8-AA)	1.31 + 0.41	0.25 + 0.06	0.15 + 0.01	1.36 + 0.7
(79-86-Alb8-AA)	2.63 + 1.74	0.26 + 0.06	0.19 + 0.02	0.72 + 0.2

26. Detección de anticuerpos de IgG que interactúan con los nanocuerpos de CXCR2 en voluntarios sanos y efecto de la extensión C-terminal.

10 Se evaluó la formación de los anticuerpos de IgG que se enlazan a CXCR20079-35GS-CXCR20076 (79-76), CXCR20079-35GS-CXCR20076-ALB8 (79-76-Alb8) CXCR20079-35GS-CXCR2 0086 (79-86) y CXCR20079-35GS-CXCR20086-ALB8 (79-86-Alb8) en suero humano mediante el rastreo del suero de un donador sano (44 machos y 44

hembras) en un ELISA de emparedado. Dicho de una manera breve, el nanocuerpo CXCR20079-35GS-CXCR20076-AlB8 se inmoviliza directamente en una placa de microtitulación. Los anticuerpos anti-nanocuerpo son capturados por el nanocuerpo inmovilizado, y son detectados por un anticuerpo de IgG-(específico de Fc) anti-humano acoplado con peroxidasa de radícula roja. Después de la incubación con el sustrato TMB, se mide la densidad óptica (OD) del producto coloreado de la reacción enzimática a 450 nanómetros. El anticuerpo de control positivo utilizado es un anticuerpo humano anti-CXCR2, NOV0205 (1M8) (generado internamente mediante exhibición de fagos), lote ACE00277. Se estima un punto de corte preliminar debido a que el ensayo no está validado, con una OD normalizada promedio (OD muestra / OD control negativo).

Se probaron los sueros de 44 donadoras hembras sanas demostrando reactividad el 50 % de las muestras de muchos y el 61 % de las muestras de hembras con los nanocuerpos progenitores por arriba del punto de corte de rastreo preliminar para el ensayo (véase la Figura más adelante).

Sin estar limitados a cualquier explicación, mecanismo o hipótesis, la evidencia sugiere que la IgG interactúa con un epítopo conformacional en el dominio Vh humanizado, una región normalmente enmascarada en los anticuerpos por el dominio CH1. Con el objeto de bloquear esta interacción, se generaron y se probaron diversas extensiones C-terminales (A, AA, AS, AST, ASTKP, GGGS) para determinar la actividad de IgG anti-Nb y funcional. Los datos mostrados en la figura más adelante muestran que el nanocuerpo biparatópico con la vida media prolongada, con una extensión AA C-terminal 79-76-Alb8-AA redujo significativamente la reactividad de IgG anti-Nb desde el 50 % hasta el 20 % en los machos, y desde el 61 % hasta el 16 % en las hembras. En adición, las variantes de Ala-Ala C-terminales 79-76-Alb8-AA y 79-86-Alb8-AA no alteraron la actividad funcional cuando se compararon con los nanocuerpos sin las extensiones C-terminales 79-76-Alb8 y 79-86-Alb8, véase la Figura 4.

27. Inhibición de quimiotaxis utilizando nanocuerpos biparatópicos para CXCR2

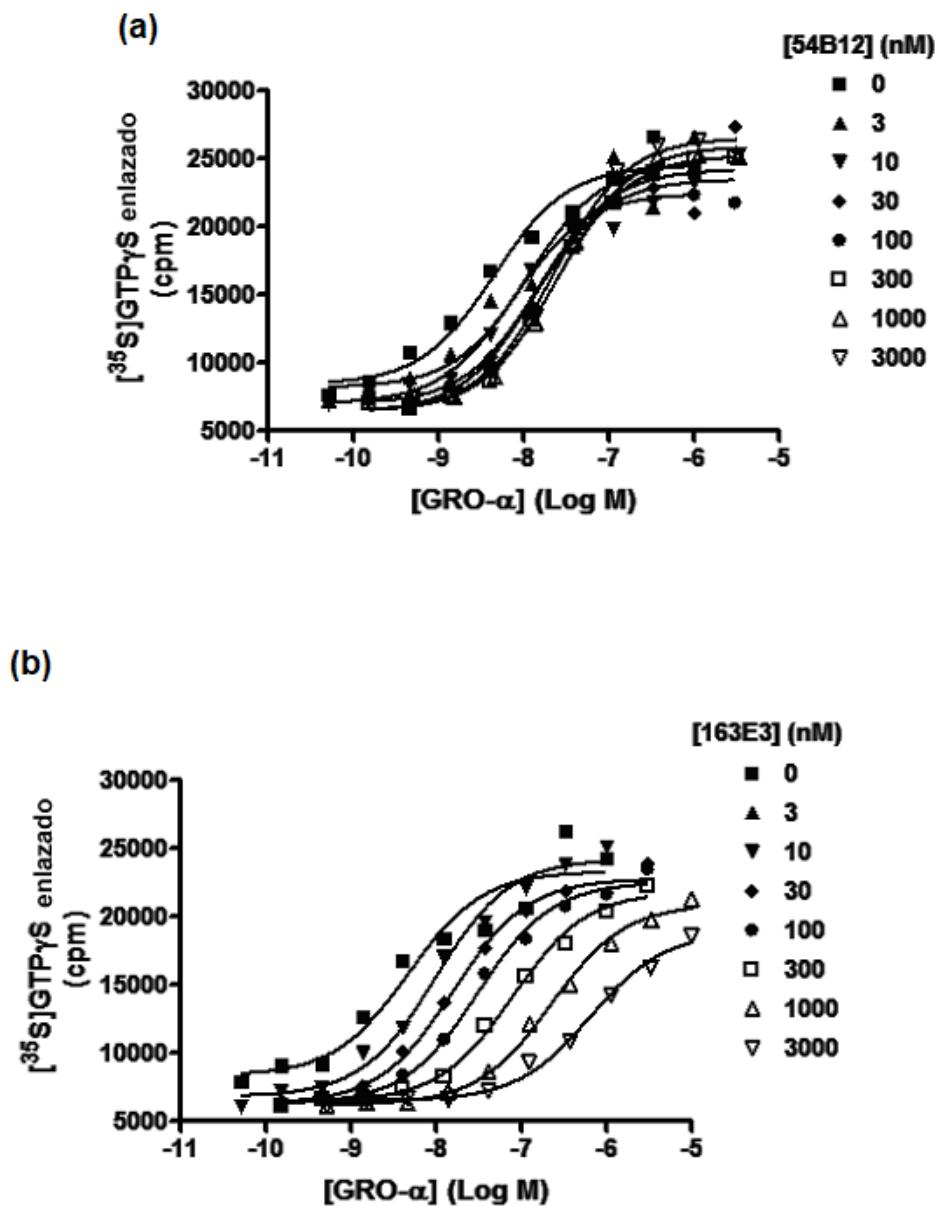
La quimiotaxis es el movimiento dirigido de una célula a lo largo de un gradiente de concentración de un producto químico. *In vivo*, esto se refiere a la migración de los fagocitos, tales como los neutrófilos, desde los vasos sanguíneos hasta los tejidos, por medio del endotelio. Para conocer las referencias, véase Boyden S (1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. J Exp Med; 115: 453-466 y Frevert C, Wong V, Goodman R et al. (1998) Rapid fluorescence-based measurement of neutrophil migration in vitro. J Immunol Métodos; 213(1): 41-52.

Con el fin de emular este proceso *in vitro* hemos desarrollado un ensayo trans-pozos, utilizando membranas de poliéster de 3 micras de Becton Dickinson. Dicho de una manera breve, se agregó un concentración EC₅₀ de la quimiocina (rhGRO-α 2 nM) a los pozos del fondo de una placa receptora, antes de bajar el inserto de múltiples pozos hasta su posición. Los neutrófilos humanos, recién aislados a partir de la sangre periférica y marcados con el tinte de viabilidad, calceína-AM, se incubaron previamente con diferentes concentraciones del nanocuerpo (de 0.007 a 30 nM) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células entonces se agregaron a los insertos de múltiples pozos, y se incubaron durante 90 minutos a 37°C antes de remover el inserto y de desecharlo. Entonces se midió la fluorescencia a partir de las células que habían migrado hacia adentro de los pozos de la placa receptora en el lector de placas BioTek Synergy a una excitación de 485 nanómetros y a una emisión de 520 nanómetros. El nanocuerpo anti-CXCR2, 79-76-Alb8-AA, inhibió la quimiotaxis estimulada por rhGRO-α con un valor de IC₅₀ de 0.256 + 0.02 nM (promedio + SEM a partir de n = 4 donadores), véase la Figura 5.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende dos dominios de enlace al antígeno de inmunoglobulina, cuyo polipéptido se dirige contra, o se enlaza a, el receptor de quimicina CXCR2, en donde el primer dominio de enlace al antígeno está comprendido dentro de un primer dominio V_{HH} o fragmento del mismo a partir de una sola cadena pesada de un anticuerpo de cadena pesada derivado a partir de un camélido, o es una variante humanizada del mismo, y dicho segundo dominio de enlace al antígeno está comprendido dentro de un segundo dominio V_{HH} o fragmento del mismo a partir de una sola cadena pesada de un anticuerpo de cadena pesada derivado a partir de un camélido, o es una variante humanizada del mismo, y en donde el término C del polipéptido comprende una extensión a la secuencia de los dominios de enlace al antígeno de al menos un residuo de aminoácido adicional; teniendo el polipéptido una de las siguientes estructuras:
- FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--ENLAZADOR--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8-EXT
 - FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--ENLAZADOR--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8--ENLAZADOR--HLE-EXT
 - FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--ENLAZADOR--HLE--ENLAZADOR--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8-EXT
 - HLE--ENLAZADOR--FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--ENLAZADOR--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8-EXT
- en donde, si FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 comprende el primer dominio de enlace al antígeno, entonces FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 comprende el segundo dominio de enlace al antígeno, y si FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 comprende el segundo dominio de enlace al antígeno, entonces FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 comprende el primer dominio de enlace al antígeno: el HLE es una unidad de enlace que proporciona una vida media in vivo incrementada y la EXT es una extensión C-terminal que se selecciona de A, AA, AS, AST, ASTKP o GGGS; y en donde el primer dominio de enlace al antígeno reconoce un primer epítopo en CXCR2 y es capaz de enlazarse a un péptido lineal que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID No. 7 y en donde el segundo dominio de enlace al antígeno se une a un epítopo dentro de los ciclos externos de CXCR2 humano (residuos de aminoácido 106-120, 184-208 y 274-294 de SEQ ID No. 1)
2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la extensión C-terminal consiste en dos residuos de alanina.
3. El polipéptido de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho primer dominio de enlace al antígeno, CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID No. 141, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID No 236 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID No 181 y en donde en dicho segundo dominio de enlace al antígeno CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID No 146, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID No 237 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID No 186.
4. El polipéptido de la reivindicación 3, en donde el primer dominio de enlace al antígeno se selecciona de SEQ ID No. 216 o un polipéptido que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID No. 216, y el segundo dominio de enlace al antígeno se selecciona de SEQ ID No. 217 o un polipéptido que tiene al menos 80% de identidad con la SEQ ID No. 217.
5. Un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende la SEQ ID No. 221 y una extensión C-terminal que consiste en dos residuos de alanina.
6. El polipéptido de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho primer dominio de enlace al antígeno se une a un epítopo que comprende los aminoácidos F11, F14 y W15 de la SEQ ID No. 1.
7. El polipéptido de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho segundo dominio de enlace al antígeno se une a un epítopo de CXCR2, que comprende los residuos de aminoácidos W112, G115, I282 y T285 de SEQ ID No. 1.
8. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que consiste en la secuencia de SEQ ID No. 225 con una extensión C-terminal que consiste en dos residuos de alanina.
9. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

11. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso como medicamento.
12. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y las exacerbaciones de la COPD.
- 5 13. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para utilizarse en el tratamiento de Fibrosis quística, Asma, en particular asma severo y exacerbaciones de Asma, Lesión pulmonar aguda, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, fibrosis pulmonar idiopática, remodelación de las vías respiratorias, Síndrome de bronquiolitis obliterante o displasia broncopulmonar.

Figura 1

(c)

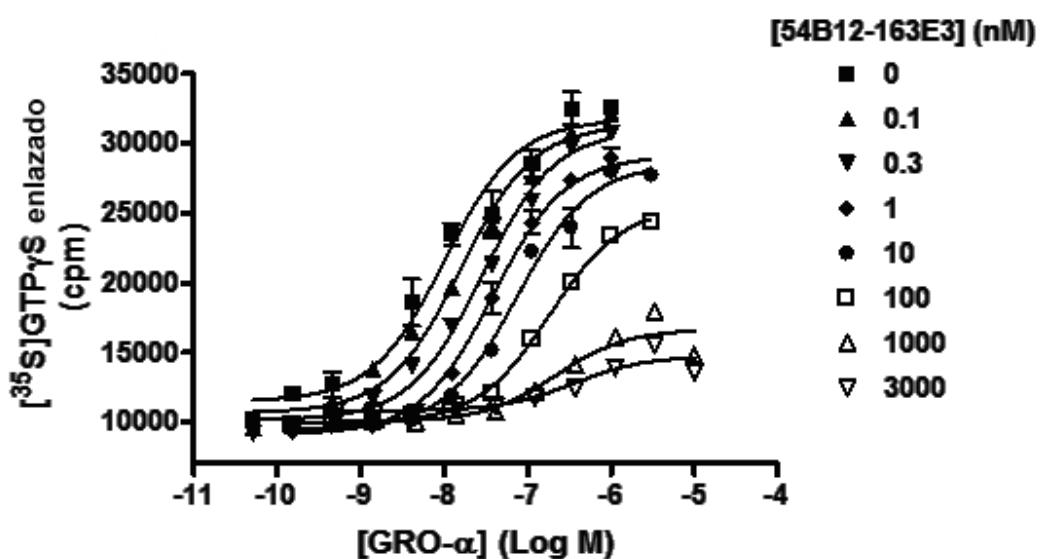
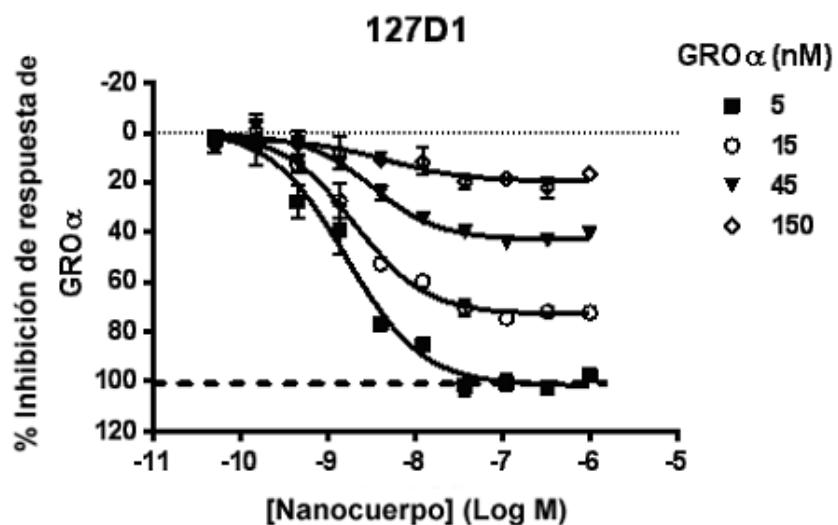
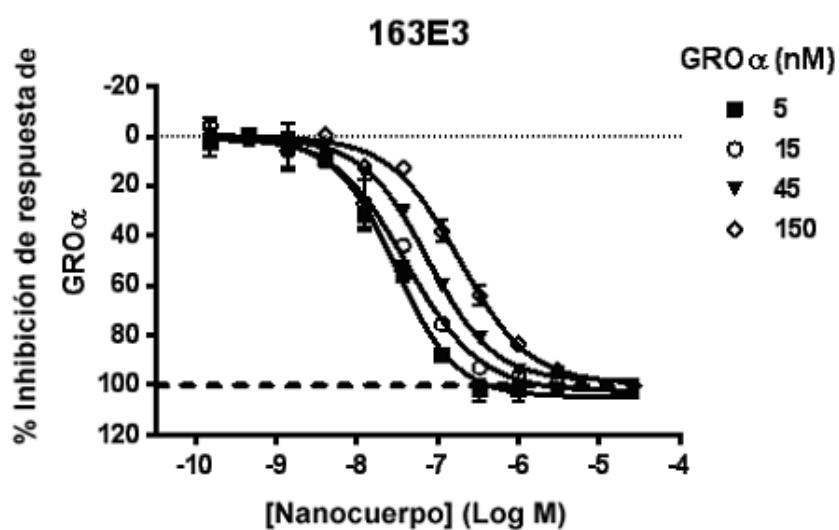


Figura 2

(a)



(b)



(c)

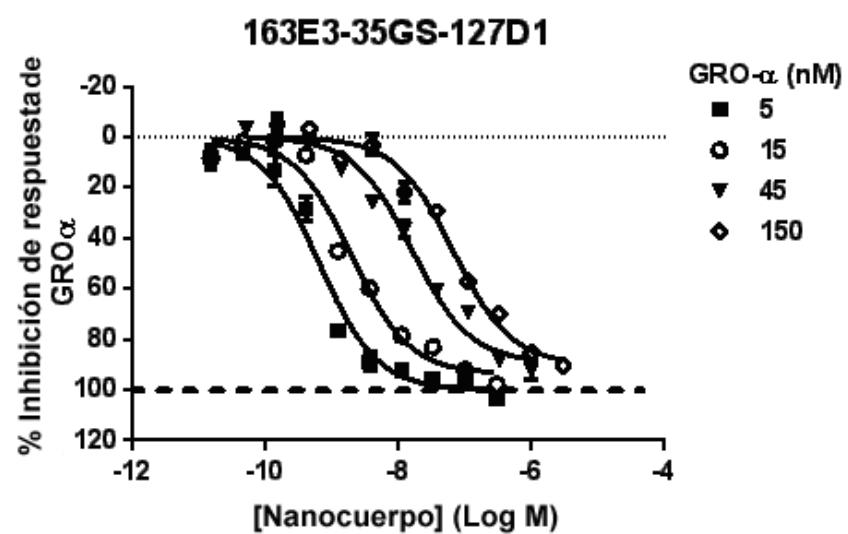


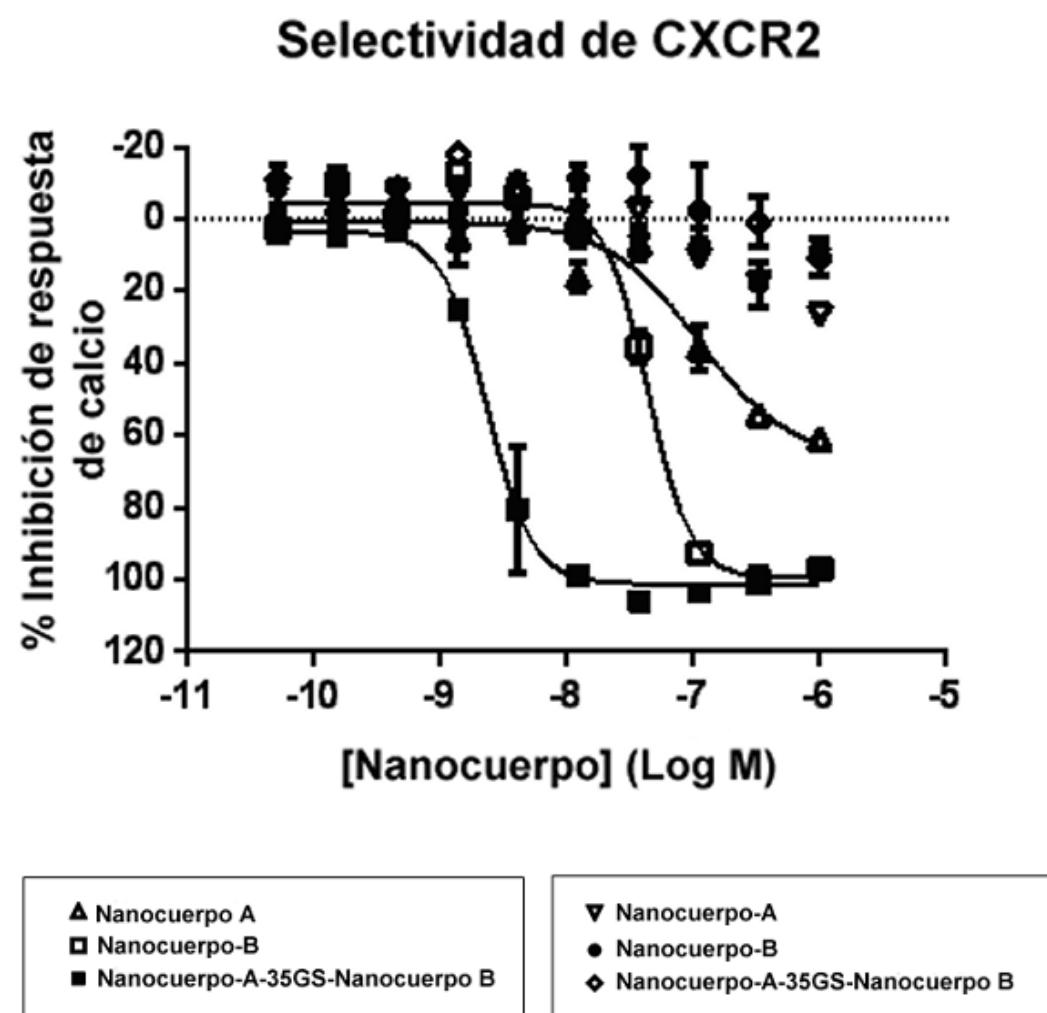
Figura 3

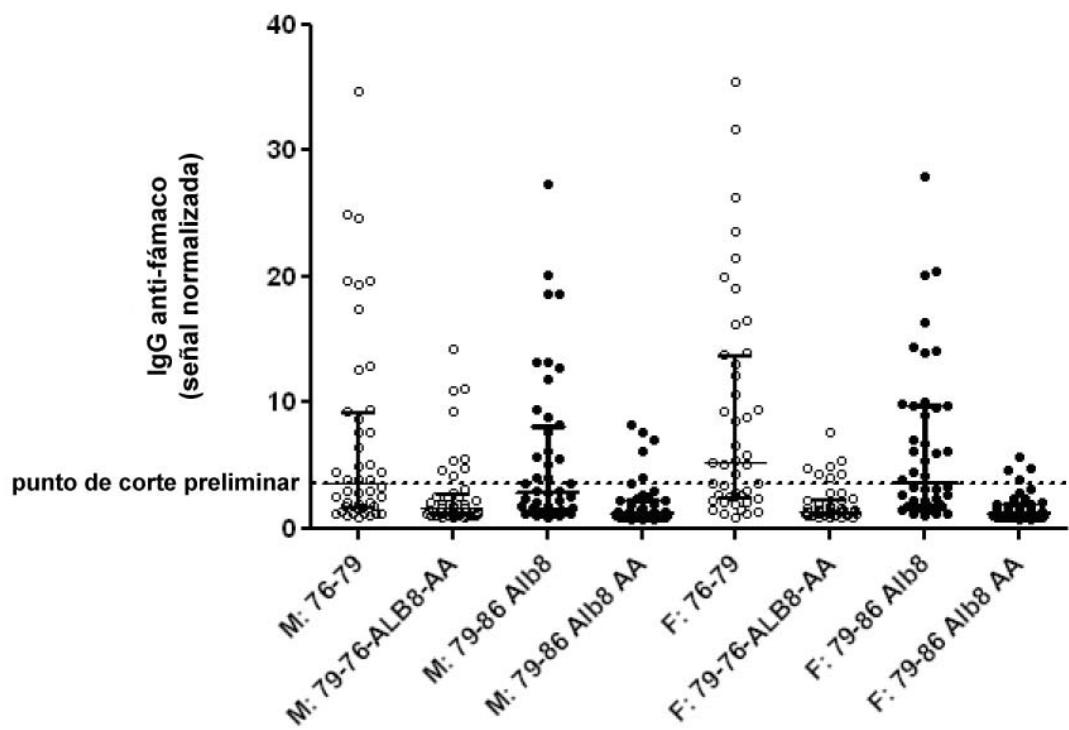
Figura 4

Figura 5

