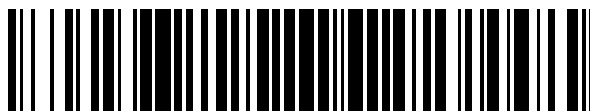


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 723 775**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2011 PCT/EP2011/069571**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2012 WO12062713**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2011 E 11785367 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2638068**

54 Título: **Polipéptidos que se unen a CXCR2**

30 Prioridad:

08.11.2010 US 411083 P

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

02.09.2019

73 Titular/es:

**ABLYNX N.V. (100.0%)
Technologiepark 21
9052 Zwijnaarde, BE**

72 Inventor/es:

**BRADLEY, MICHELLE;
BROWN, ZARIN;
CHARLTON, STEVEN JOHN;
CROMIE, KAREN;
DOMBRECHT, BRUNO;
STEFFENSEN, SOREN y
VAN HEEKE, GINO**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 723 775 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 que se unen a CXCR2

La presente invención se refiere a polipéptidos dirigidos contra el receptor de quimiocinas CXCR2 o que se unen específicamente a este y, en particular, a polipéptidos capaces de modular la transducción de señales de CXCR2. La invención también se refiere a ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras capaces de expresar los polipéptidos de la invención, a composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos y a usos de dichos polipéptidos y composiciones para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y otras enfermedades que conllevan un funcionamiento aberrante de CXCR2.

Antecedentes de la invención

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una expresión utilizada para describir una serie de trastornos caracterizados por una limitación del flujo de aire que en la mayor parte de los casos es progresiva y está asociada con una respuesta inflamatoria anormal del pulmón a partículas nocivas, con destrucción de la parénquima pulmonar que da lugar a un deterioro en 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.*, 2004, *Mediators of chronic obstructive pulmonary disease*. *Pharmacol. Rev.*, **56**, 515-548). Aunque algunos factores genéticos y ambientales contribuyen al desarrollo de la EPOC, el tabaquismo es la causa individual de mayor importancia, con infecciones de pulmón recurrentes que dan lugar a un deterioro progresivo en la función pulmonar. El hecho de dejar de fumar reduce la progresión de la enfermedad solamente si se pone en práctica pronto y tiene pocos efectos después de que aparezcan síntomas significativos. Varias afecciones comórbidas se asocian con la EPOC tales como asma, patología cardiovascular, depresión y atrofia muscular (Mannino DM y Buist S, 2007 *Global burden of COPD: risk factors, prevalence and future trends*. *Lancet*, **370**, 765-773).

Las quimiocinas predominan entre los factores quimiotácticos y, por lo tanto, tienen una función crucial en la coordinación de la inflamación crónica en los pulmones con EPOC y su amplificación adicional durante las exacerbaciones agudas. La actividad biológica de las quimiocinas IL-8 (CXCL8), GRO α (CXCL1) y ENA-78 (CXCL5) está mediada por dos poblaciones de receptores de la superficie celular CXCR1 y CXCR2, los cuales están presentes en los leucocitos y en muchos otros tipos de células por todo el cuerpo. La migración de los leucocitos está mediada principalmente a través de CXCR2, el cual se une a varios ligandos que incluyen IL-8, GRO α , β , γ , ENA78 y GCP-2. Por el contrario, CXCR1 es activado selectivamente por IL-8 y, en menor medida, por GCP-2. Aún no se ha esclarecido si la quimiotaxis de neutrófilos humanos *in vivo* está mediada por uno o ambos receptores.

El CXCR2 comparte un 78% de homología a nivel de aminoácidos con CXCR1 y ambos receptores se encuentran presentes en los neutrófilos con diferentes patrones de distribución. La expresión de CXCR2 en una serie de células y tejidos que incluyen los linfocitos T CD8+, NK, monocitos, mastocitos, células epiteliales, endoteliales, de músculo liso y una serie de tipos de células en el sistema nervioso central sugiere que este receptor puede tener un papel funcional amplio tanto en las condiciones constitutivas como en la patofisiología de una serie de enfermedades agudas y crónicas. La activación de CXCR2 estimula el acoplamiento del receptor con la familia Gi de proteínas que se unen al nucleótido guanina, esto a su vez estimula la liberación de fosfoinosítidos intracelulares, una mayor concentración de Ca²⁺ intracelular y, por mecanismos dependientes de ERK1/2, la fosforilación de proteínas intracelulares asociadas con la migración celular dirigida a un gradiente de quimiocinas. Una vez activado, el CXCR2 se fosforila y es rápidamente internalizado mediante mecanismos dependientes de arrestina/dinamina, lo que da como resultado una desensibilización de los receptores. Este proceso es similar al observado con la mayor parte de los demás GPCR, pero la velocidad y la extensión de la internalización inducida por agonistas de CXCR2 es superior a la observada con 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).

Hace tiempo que la IL-8 se ha vinculado como mediador de la inflamación neutrofílica en la EPOC (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 biopsias de las vías aéreas bronquiales, las vías aéreas finas y la parénquima pulmonar de pacientes con EPOC, existe una infiltración de linfocitos T y valores aumentados de neutrófilos, particularmente en el lumen de las vías aéreas (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 pacientes con EPOC 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). Además, los niveles de TNF α aumentan en el esputo de los pacientes con EPOC y esto induce la IL-8 de las células epiteliales de las vías aéreas (Keatings). La concentración de GRO α es notablemente elevada en el fluido de esputo inducido y de lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes con EPOC en comparación con fumadores normales y 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**, 50-595; Pesci A. *et al.* 1998, *Inflammatory cells and mediators*

in bronchial lavage of patients with COPD. *Eur Respir J.* **12**, 380-386). El GRO α es secretado por los macrófagos alveolares y las células epiteliales de las vías aéreas en respuesta a la estimulación de TNF α y activa selectivamente CXCR2, con lo cual es quimiotáctico para neutrófilos y monocitos. Existe un aumento en la respuesta quimiotáctica de monocitos a GRO α en pacientes de EPOC, lo cual podría estar relacionando con un mayor recambio o reciclado de 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 frecuentemente da como resultado exacerbaciones graves en pacientes de EPOC que se caracteriza por cifras mayores de neutrófilos en las vías aéreas (Wedzicha JA, Seemungal TA., 2007, *COPD exacerbations: defining their cause and prevention*, *Lancet* **370** (9589): 786-96). Las biopsias bronquiales de pacientes con exacerbaciones graves agudas de EPOC tienen cantidades significativamente mayores de ENA-78, IL-8 y expresión de ARNm de 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) lo que sugiere una función potencial de este receptor tanto en la EPOC como en las exacerbaciones graves de esta enfermedad. Una expresión aumentada de ARNm de CXCR2 se encuentra presente en las muestras de biopsias bronquiales, lo que se correlaciona con la presencia de neutrófilos tisulares (Qiu 2003). El ENA-78 procede predominantemente de las células epiteliales y existe un marcado aumento en la expresión de ENA-78 en las células epiteliales durante las exacerbaciones de EPOC (Qiu 2003). Como las concentraciones de IL-8, GRO α y ENA-78 son mayores en las vías aéreas con EPOC, y los tres ligandos señalizan a través de CXCR2, el hecho de bloquear este receptor común con antagonistas selectivos sería una estrategia antiinflamatoria eficaz en esta enfermedad.

La EPOC evoluciona lenta y progresivamente, y la progresión de la enfermedad se estima de forma tradicional con pruebas de la función pulmonar tales como medidas espirométricas de volumen espiratorio forzado (FEV1). Los pacientes con un FEV1 predicho <50% se clasifican como graves. La función pulmonar está estrechamente relacionada con la tasa de mortalidad, ya que cerca de un 35% de pacientes de EPOC graves mueren a causa de esta enfermedad en un plazo de 12 años en comparación con solamente un 5% de pacientes leves a moderados. La EPOC es la cuarta causa principal de muerte en el mundo (Organización Mundial de la Salud (OMS), Informe de la Salud en el Mundo, Ginebra, 2000. Disponible en la URL: http://www.who.int/whr/2000/en/whr00_annex_en.pdf) y se pueden predecir más aumentos 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 descendente de mala salud y son en gran medida responsables de la gran mayoría de admisiones hospitalarias por EPOC (BTS (Sociedad Torácica Británica, por sus siglas en inglés)), 2006, *Burden of Lung Disease Report*, 2.^a ed., http://www.brit-thoracic.org.uk/Portals/0/Library/BTS%20Publications/burden_of_lung_disease2007.pdf). Las tasas anuales medias fueron de 2.3 para las exacerbaciones definidas por los síntomas y de 2.8 para las definidas por la atención sanitaria (O'Reilly JF, Williams AE, Holt K *et al*, 2006, *Prim Care Respir J.* **15**(6):346-53). El diagnóstico más temprano y la gestión mejorada para las exacerbaciones de los pacientes, así como la prevención mejorada contribuirían a reducir la sobrecarga que estas admisiones producen en unos recursos ya escasos. Los tratamientos disponibles para la EPOC son principalmente paliativos y no existen terapias disponibles que detengan el deterioro de la función pulmonar o la destrucción progresiva de las vías aéreas asociada con la enfermedad. Los tratamientos actuales tales como broncodilatadores β -adrenérgicos de acción corta y prolongada, anticolinérgicos inhalados (antagonistas muscarínicos) y corticoesteroides inhalados se utilizan para tratar los síntomas y las exacerbaciones de la enfermedad. Una limitación principal con la terapia de corticoesteroides actual es que se vuelven ineficaces a medida que los pacientes muestran resistencia a los corticoesteroides, lo que inactiva la acción antiinflamatoria de estos fármacos. Claramente existe aún una gran necesidad médica no satisfecha de fármacos novedosos que prevengan la progresión de la EPOC. Los antagonistas de receptores de quimiocinas son una estrategia atractiva para terapia de la EPOC, ya que el tráfico celular inflamatoria en la EPOC está coordinado por múltiples quimiocinas, de modo que el bloqueo de los receptores de quimiocina con antagonistas de LMW podría ser una estrategia antiinflamatoria eficaz en esta enfermedad. Una característica crucial en la EPOC es una amplificación de la respuesta inflamatoria observada en los fumadores normales, por lo que el objetivo de la terapia no es suprimir la infiltración celular inflamatoria por completo, sino reducirla a los niveles observados en los fumadores normales sin EPOC. Al actuar de forma específica, los anti-CXCR2 evitarían la supresión inmunitaria general asociada con los esteroides, la preservación de la actividad de CXCR1 permitirá la activación de neutrófilos basal, importante para la defensa del hospedador en la EPOC y la FC. La mayoría de fármacos para la EPOC se administran actualmente por inhalación para reducir los efectos secundarios sistémicos, sin embargo, como los antagonistas de quimiocinas actúan sobre los receptores expresados en las células inflamatorias circulantes, la administración sistémica sería óptima. Esto proporcionaría una manera eficiente de alcanzar las vías aéreas finas y la parénquima pulmonar que están afectadas por la EPOC.

Los receptores de quimiocinas, al contrario que los receptores de citocinas e interleucinas, pertenecen a la superfamilia muy «farmacoconvertible» de 7TM-GPCR. A pesar de esto, los primeros intentos para encontrar antagonistas potentes se encontraron con más dificultades de las anticipadas basándose en la experiencia con GPCR que tienen ligandos de tipo amina biogénica o péptido de bajo peso molecular. Con los esfuerzos en programas de descubrimiento de fármacos de bajo peso molecular que se centraban en antagonistas de receptores de quimiocinas se empezaron a entender progresivamente las idiosincrasias de los receptores de quimiocinas y los elementos estructurales requeridos

para que las moléculas de bajo peso molecular actuaran como antagonistas. Curiosamente, la diversidad estructural de los antagonistas de receptores de quimiocinas CC, tal como se representa con el número de series químicas fundamentalmente diferentes identificadas, es considerablemente superior que para los antagonistas de receptores de quimiocinas CXC, lo que sugiere que la dificultad relativa para encontrar antagonistas puede ser diferente entre las dos clases de receptores.

Por lo general, los receptores de quimiocinas han resultado ser dianas difíciles de antagonizar y ha conllevado un gran esfuerzo identificar antagonistas de CXCR2 potentes selectivos. El primer antagonista de CXCR2 de bajo peso molecular se describió en 1998, desde entonces se han desarrollado una serie de antagonistas de CXCR2 alostéricos no competitivos, varios de los cuales han progresado ya a ensayos clínicos. No obstante, existe claramente una necesidad de antagonistas mejores y más potentes de la función CXCR2.

Las moléculas de la clase de las inmunoglobulinas han experimentado una gran expansión en su utilidad clínica durante los últimos diez años aproximadamente. Su especificidad por una diana y la capacidad para modificarlas utilizando técnicas recombinantes proporciona un gran potencial para desarrollar un tratamiento muy dirigido para la enfermedad. Muchos tipos de moléculas de inmunoglobulinas y moléculas de inmunoglobulinas modificadas se encuentran potencialmente disponibles para modificarse de forma adecuada que incluyen anticuerpos de tetracatenarios convencionales, fragmentos Fab y F(ab)₂, anticuerpos de dominio único (D(ab)s), Fv monocatenarios y nanocuerpos. Estos se discutirán en más profundidad en la presente en relación con la invención que se ocupa de polipéptidos contruidos para dirigirse contra al menos dos epítomos de CXCR2.

El documento US5440021 divulga anticuerpos contra CXCR2 y el documento WO01/72830 divulga una generación de anticuerpos contra CXCR2 que utiliza péptidos que comprenden los bucles extracelulares o N-terminales de CXCR2.

Muyldermans *et al.* "Single domain camel antibodies: Current status" *Rev. Mol. Biotech.* Vol.74, 4, 1 de junio de 2001, págs. 277-302.; Holliger *et al.* "Engineered antibody fragments and the rise of single domains" *Nature Biotech.* 23, 9, 1 de septiembre de 2005 págs. 1126-1136 así como el documento WO04/081026 divulga el concepto de anticuerpos biespecíficos y biparatópicos que incluyen constructos que comprenden 2 fragmentos VHH.

El documento WO10/043650 divulga nanocuerpos multiparatópicos contra CXCR4, otro miembro de la familia de receptores de quimiocinas.

Gabellini *et al.* "Functional activity of CXCL8 receptors, CXCR1 and CXCR2, on human malignant melanoma progression", *Eur. J. Cancer*, 45, 14, 1 de septiembre de 2009 págs. 2618-2627, divulga el uso de anticuerpos neutralizadores contra el melanoma maligno.

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

Es un objeto adicional de la invención proporcionar un medio de tratamiento o prevención de la EPOC y otras enfermedades asociadas con el funcionamiento aberrante de CXCR2 que es una inmunoterapia.

Es otro objeto adicional de la invención proporcionar un polipéptido que comprende CDR de inmunoglobulinas que es un antagonista de la transducción de señales de CXCR2.

Compendio de la invención

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información que no esté comprendida dentro de las reivindicaciones se proporciona únicamente por información.

La presente invención se refiere a un polipéptido que comprende al menos dos dominios de unión a antígeno de inmunoglobulinas, donde el polipéptido se dirige contra el receptor de quimiocinas CXCR2 o se une a él, donde dicho polipéptido incluye un primer dominio de unión a antígeno que reconoce un primer epítipo en CXCR2 y un segundo dominio de unión a antígeno que reconoce un segundo epítipo en CXCR2. El polipéptido de la invención comprende un primer dominio de unión a antígeno que es capaz de unirse a un péptido lineal que consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 7 y un segundo dominio de unión a antígeno que se une a un epítipo dentro de los bucles externos del CXCR2 humano (residuos de aminoácidos 106-120, 184-208 y 274-294 de la SEQ ID N.º 1). La SEQ ID NO. 7 son los primeros 19 aminoácidos N terminales del CXCR2 humano. El polipéptido de la invención es biparatópico. Tal como se utiliza en la presente, el término «biparatópico» se refiere a que un polipéptido comprende dos dominios de unión a antígeno que reconocen dos epítomos diferentes en la misma diana proteica. Sin embargo, los polipéptidos que son multiparatópicos, es decir, que contienen dominios de unión a antígeno que reconocen tres, cuatro o más epítomos en la misma proteína diana, están englobados dentro del alcance de la invención, así como lo están los polipéptidos que son tanto bi- o multiparatópicos como multivalentes, es decir, que tienen también dominios

de unión a antígeno que reconocen una o más proteínas diana diferentes.

En los polipéptidos preferidos de la invención, una secuencia de aminoácidos que comprende el primer dominio de unión a antígeno y la secuencia de aminoácidos que comprende el segundo dominio de unión a antígeno se unen mediante una región conectora. Tal como se discute en más detalle en la presente, el conector puede o no ser de origen inmunoglobulínico, pero es preferentemente un péptido.

De acuerdo con la invención, dicho primer dominio de unión a antígeno está comprendido dentro de un primer dominio variable único de inmunoglobulina y dicho segundo dominio de unión a antígeno está comprendido dentro de un segundo dominio variable único de inmunoglobulina. Al menos uno de dichos primer y segundo dominios variables únicos de inmunoglobulina puede ser un dominio V_L o ser un fragmento de este o puede ser un dominio V_H o ser un fragmento de este. Los polipéptidos en los que cada uno del primer y segundo dominios de unión a antígeno están comprendidos con dominios V_L o fragmentos de estos o en los que cada uno del primer y segundo dominios de unión a antígeno están comprendidos dentro de dominios V_H o fragmentos de estos están englobados en la invención. El polipéptido de la invención puede comprender tanto secuencias de aminoácidos de V_L como de V_H o fragmentos de estas dentro de una única molécula.

En realizaciones preferidas adicionales, el primer y segundo dominios de unión a antígeno están comprendidos dentro de un primer y segundo dominios variables únicos de inmunoglobulina que son anticuerpos de dominio (dAb). En una realización sumamente preferida, al menos uno y preferentemente ambos de dichos primer y segundo dominios de unión a antígeno están comprendidos con dominios variables únicos de inmunoglobulina que son un dominio V_{HH} o son un fragmento de este procedente de una cadena pesada única de un anticuerpo de cadena pesada que se puede obtener de un camélido o es una versión humanizada de este en la que se ha incorporado al menos una sustitución humanizante en las regiones de marco.

Un dominio variable único de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos de V_{HH} o un fragmento o variante de este, procedente de un anticuerpo con solamente cadenas pesadas del tipo que se puede obtener de camélidos se puede denominar en la presente alternativamente como un «dominio V_{HH} » o fragmento de este o como un «Nanocuerpo». Cabe destacar que Nanobody®, Nanobodies® y Nanoclone® son marcas registradas de Ablynx N.V.

En los polipéptidos de la invención, cada dominio de unión a antígeno comprende al menos una CDR tal como se ha definido en la presente y, preferentemente, dos o tres CDR. En los polipéptidos preferidos de la invención, la estructura preferida del dominio variable único de inmunoglobulinas es la de un dominio V_{HH} o Nanocuerpo y que tiene la estructura:

FR-CDR-FR-CDR-FR-CDR-FR

donde CDR y FR son como se definen adicionalmente en la presente.

Los Nanocuerpos biparatópicos preferidos de acuerdo con la invención tienen una de las siguientes estructuras:

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

donde si FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 comprende el primer dominio de unión a antígeno (ligante de SEQ ID N.º 7 lineal), entonces FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 comprende el segundo dominio antigénico (no ligante de SEQ ID N.º 7 lineal) y si FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 comprende el segundo dominio antigénico (no ligante de SEQ ID N.º 7 lineal), entonces FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 comprende el primer dominio de unión a antígeno (ligante de SEQ ID N.º 7 lineal) y el HLE es una unidad ligante que proporciona una semivida *in vivo* mayor.

Los fragmentos o variantes de los Nanocuerpos biparatópicos preferidos anteriores están englobados por la invención, incluidas las realizaciones en las que las CDR y FR son de origen Camélido o las realizaciones en las que una o más de las FR tienen al menos una sustitución humanizante y están preferentemente humanizadas por completo.

Algunos Nanocuerpos biparatópicos particularmente preferidos de acuerdo con la invención son los designados en la presente como 163D2/127D1, 163E3/127D1, 163E3/54B12, 163D2/54B12, 2B2/163E3, 2B2/163D2, 97A9/2B2 y 97A9/54B12, cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la Tabla 13 y, en particular, variantes de estos en las que las FR incluyen sustituciones de aminoácidos de optimización de secuencia tal como se definen en la presente y tal como se muestran para los Nanocuerpos componentes en la Tabla 32.

Algunos Nanocuerpos biparatópicos particularmente preferidos adicionales de acuerdo con la invención son los mostrados en la Tabla 33.

Los polipéptidos de la invención son moduladores de la transducción de señales de CXCR2 y bloquean, reducen o inhiben la actividad de CXCR2. Estos pueden inhibir la unión del ligando natural, por ejemplo, Gro- α , al CXCR2 humano con una CI50 inferior a 20 nM. Preferentemente, los polipéptidos de la invención y, en particular, los Nanocuerpos biparatópicos de la invención, son capaces de bloquear de forma cruzada la unión a CXCR2 con uno o más de los 163D2/127D1, 163E3/127D1, 163E3/54B12, 163D2/54B12, 2B2/163E3, 2B2/163D2, 97A9/2B2 y 97A9/54B12 discutidos anteriormente.

También están englobados por la invención descrita en la presente los componentes polipeptídicos monovalentes que se utilizan en los constructos de Nanocuerpos bi- o multiparatópicos o multivalentes. Los Nanocuerpos monovalentes preferidos son todos y cada uno de los polipéptidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en la Tabla 9, la Tabla 34 o las secuencias de aminoácidos en las que al menos una de las regiones de marco tiene al menos un 80% de identidad aminoacídica con una secuencia de aminoácidos expuesta en la Tabla 9 o la tabla 34. Los Nanocuerpos monovalentes preferidos son aquellos expuestos en la Tabla 9 y, pero con al menos una sustitución de optimización de secuencia en la región de marco tal como aquellos Nanocuerpos mostrados en la Tabla 32 o la tabla 34. Se prefiere particularmente el Nanocuerpo monovalente designado 137B7 y las versiones con secuencia optimizada de este.

Los polipéptidos preferidos de la invención se unen a un epítipo de que comprende los aminoácidos F11, F14 y W15 de SEQ ID N.º 1 (CXCR2). En los polipéptidos biparatópicos preferidos de la invención tales como los nanocuerpos biparatópicos, el segundo dominio de unión a antígeno se une a un epítipo dentro de los bucles externos del CXCR2 humano (residuos de aminoácidos 106-120, 184-208 y 274-294 de la SEQ ID N.º 1). En una realización de la invención dicho epítipo es conformacional. En una realización de la invención dicho epítipo comprende los residuos de aminoácidos W112, G115, I282 y T285 de SEQ ID N.º 1.

La invención también engloba moléculas de ácido nucleico que codifican cualquier polipéptido de acuerdo con la invención, así como ácidos nucleicos que codifican fragmentos de este tales como 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 hospedadoras que comprenden dichos vectores y que pueden expresar un polipéptido de acuerdo con la invención también están englobados dentro de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de acuerdo con la invención combinado con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Como los polipéptidos de la invención son capaces de bloquear, inhibir o reducir la actividad de CXCR2, son útiles para el tratamiento de enfermedades en las que la transducción de señales aberrante de CXCR2 desempeña una función. Dichas enfermedades pueden incluir aterosclerosis, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria del intestino (de Chron), angiogénesis, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad degenerativa macular asociada a la edad, enfermedad de Behcet ocular, uveítis, carcinoma no microcítico, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer esofágico, melanoma, carcinoma hepatocelular o lesión por isquemia-perfusión. Dichas enfermedades también pueden incluir afecciones del tracto respiratorio tales como fibrosis quística, asma grave, exacerbación del asma, asma alérgica, lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda, fibrosis pulmonar idiopática, remodelación de las vías aéreas, síndrome de bronquiolitis obliterante o displasia broncopulmonar.

En una realización particularmente preferida, los polipéptidos de la invención son para su uso en el tratamiento del trastorno pulmonar obstructivo crónico (EPOC) o exacerbaciones del EPOC, que se caracteriza por la migración de leucocitos, en particular neutrófilos, a la parénquima pulmonar y la posterior destrucción de estos, cuya migración está mediada por la señalización de CXCR2. La capacidad de los polipéptidos de la invención para bloquear, inhibir o reducir la actividad de CXCR2 los hace excelentes candidatos para su uso en la prevención o el tratamiento de esta enfermedad.

Para el tratamiento de seres humanos es preferible que el polipéptido de la invención se dirija contra CXCR2 humano o se una específicamente a él. Se prefiere, sin embargo, si dicho polipéptido puede reaccionar de forma cruzada con CXCR2 de primate, en particular, CXCR2 de macaco cinomolgo, con el fin de que se pueda llevar a cabo una evaluación de la toxicidad apropiada en dichos macacos. Los polipéptidos de la invención se pueden dirigir contra homólogos de CXCR2 de otras especies o unirse específicamente a ellos si se contempla el uso veterinario.

Otros aspectos de la invención serán evidentes a partir de la discusión adicional en la presente.

Definiciones

En la presente descripción, ejemplos y reivindicaciones:

a) A menos que se indique o defina de otro modo, todos los términos utilizados tienen su significado habitual en la técnica, que será claro para el experto. Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales estándar mencionados de la siguiente manera. Sambrook *et al*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2.^a Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel *et al*, eds., "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", 2.^a edición, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt *et al.*, "Immunology" (6.^a Ed.), Mosby/Elsevier, Edinburgh (2001); Roitt *et al.*, Roitt's Essential Immunology, 10 Ed. Blackwell Publishing, RU (2001); y Janeway *et al.*, "Immunobiology" (6th Ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York (2005).

b) A menos que se indique lo contrario, el término «inmunoglobulina» o la expresión «secuencia de inmunoglobulina», ya 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 completo, como sus cadenas individuales, así como también todas sus partes, dominios o fragmentos (incluidos, sin carácter limitante, dominios o fragmentos de unión a antígeno tales como los dominios V_{HH} o los dominios V_H/V_L, respectivamente). Además, se debería entender generalmente que el término «secuencia» tal como se utiliza en la presente (por ejemplo, en expresiones como «secuencia de inmunoglobulina», «secuencia de anticuerpo», «secuencia de dominio variable», «secuencia V_{HH}» o «secuencia proteica») incluye tanto la secuencia de aminoácidos relevante como las secuencias de ácido nucleico o secuencias de nucleótidos que la codifican, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada.

c) A menos que se indique lo contrario, la expresión «dominio variable único de inmunoglobulina» se utiliza como una expresión general para incluir, sin carácter limitante, dominios o fragmentos de unión a antígeno tales como dominios V_{HH} o dominios V_H o V_L, respectivamente. Las expresiones moléculas que se unen a antígeno o proteínas que se unen a antígeno se utilizan indistintamente e incluyen también el término Nanocuerpos. Los dominios variables únicos de inmunoglobulina son además secuencias de dominios variables de cadena ligera (p. ej., una secuencia V_L), o secuencias de dominios variables de cadena pesada (p. ej., una secuencia V_H), más específicamente, pueden ser secuencias de dominios variables de cadena pesada que proceden de un anticuerpo tetracatenario convencional o secuencias de dominios variables de cadena pesada que proceden de un anticuerpo de cadena pesada. Por consiguiente, los dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden ser anticuerpos de dominio o secuencias de inmunoglobulina que son adecuadas para su uso como anticuerpos de dominio, anticuerpos de dominio único o secuencias de inmunoglobulinas que son adecuadas para su uso como anticuerpos de dominio único, «dAb» o secuencias de inmunoglobulinas que son adecuadas para su uso como dAb, o Nanocuerpos, que incluyen, sin carácter limitante, secuencias V_{HH}. La invención incluye secuencias de inmunoglobulina de origen diferente, que comprenden secuencias de inmunoglobulina de ratón, rata, conejo, burro, humanas y de camélido. El dominio variable único de inmunoglobulina incluye secuencias de inmunoglobulinas totalmente humanas, humanizadas, con secuencia optimizada de otro modo o quiméricas. Se puede considerar que el dominio variable único de inmunoglobulina y la estructura de un dominio variable único de inmunoglobulina, no obstante, sin limitarse a ello, está compuesto por cuatro regiones de marco de «FR» que se denominan en la técnica y en la presente «Región de marco 1» o «FR1», «Región de marco 2» o «FR2», «Región de marco 3» o «FR3», y «Región de marco 4» o «FR4», respectivamente, donde las regiones de marco están interrumpidas por tres regiones determinantes de la complementariedad o «CDR», que se denominan en la técnica como «Región determinante de la complementariedad 1» o «CDR1», como «Región determinante de la complementariedad 2» o «CDR2» y como «Región determinante de la complementariedad 3» o «CDR3», respectivamente.

d) A menos que se indique de otro modo, todos los métodos, pasos, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle se pueden llevar a cabo y se han llevado a cabo de una manera conocida de por sí, como quedará claro para el experto. Se hace referencia de nuevo, por ejemplo, a los manuales estándar y a los antecedentes generales mencionados en la presente, y a las referencias adicionales citadas allí; así como, por ejemplo, a las siguientes revisiones 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 Suppl. A, S106-12, Gonzales *et al.*, *Tumour Biol.*, 2005, 26(1), 31-43, que describen técnicas para la modificación de proteínas tales como la maduración de la afinidad y otras técnicas para mejorar la especificidad y otras propiedades deseadas de proteínas tales como las inmunoglobulinas.

e) Los residuos de aminoácidos se indicarán de acuerdo con el código de aminoácido de una letra o de tres letras estándar.

f) A efectos de comparar dos o más secuencias de nucleótidos, el porcentaje de «identidad de secuencia» entre una primera secuencia de nucleótidos y una segunda secuencia de nucleótidos se puede calcular o determinar dividiendo [el número de nucleótidos en la primera secuencia de nucleótidos que son idénticos a los nucleótidos en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de nucleótidos] por [el número total de nucleótidos en la primera secuencia de nucleótidos] y multiplicando por [100%] donde cada delección, inserción, sustitución o adición de un nucleótido en la segunda secuencia de nucleótidos, en comparación con la primera secuencia de nucleótidos, se considera como una diferencia en un único nucleótido (posición), o utilizando una técnica o algoritmo informático adecuado. El grado de identidad de secuencia entre dos o más secuencias de nucleótidos se puede calcular utilizando un algoritmo informático conocido para la alineación de secuencias tal como NCBI Blast v2.0, utilizando ajustes estándar. Algunas otras técnicas, algoritmos informáticos y ajustes para determinar el grado de identidad de secuencia se describen, por ejemplo, en los documentos WO 04/037999, EP 0 967 284,

EP 1 085 089, WO 00/55318, WO 00/78972, WO 98/49185 y GB 2 357 768-A. Normalmente, con el fin de determinar el porcentaje de «identidad de secuencia» entre dos secuencias de nucleótidos de acuerdo con el método de cálculo resumido anteriormente en la presente, la secuencia de nucleótidos con el número mayor de nucleótidos se tomará como la «primera» secuencia de nucleótidos y la otra secuencia de nucleótidos se tomará como la «segunda» secuencia de nucleótidos.

g) A efectos de comparar dos o más secuencias de aminoácidos, el porcentaje de «identidad de secuencia» entre una primera secuencia de aminoácidos y una segunda secuencia de aminoácidos (también denominada en la presente como «identidad de aminoácidos») se puede calcular o determinar dividiendo [el número de residuos de aminoácidos en la primera secuencia de aminoácidos que son idénticos a los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de aminoácidos] por [el número total de residuos de aminoácidos en la primera secuencia de aminoácidos] y multiplicando por [100%], donde cada delección, inserción, sustitución o adición de un residuo de aminoácido en la segunda secuencia de aminoácidos, en comparación con la primera secuencia de aminoácidos, se considera como una diferencia en un único residuo de aminoácido (posición), es decir, como una «diferencia de aminoácido» tal como se ha definido en la presente, o utilizando una técnica o algoritmo informático adecuado. Con el fin de determinar el porcentaje de «identidad de secuencia» entre dos secuencias de aminoácidos de acuerdo con el método de cálculo resumido anteriormente en la presente, la secuencia de aminoácidos con el número mayor 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.

Además, para determinar el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos, el experto puede tener en cuenta sustituciones de aminoácidos denominadas «conservativas», tal como se divulgan en v) más adelante.

Las sustituciones de aminoácidos aplicadas a los polipéptidos descritos en la presente también se pueden basar en el análisis de las frecuencias de variaciones de aminoácidos entre proteínas homólogas de especies diferentes desarrolladas por Schulz et al., *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, 1978, en los análisis de potenciales de formación de estructuras desarrollados por Chou y Fasman, *Biochemistry* 13: 211, 1974 y *Adv. Enzymol.*, 47: 45-149, 1978, y en los análisis de patrones de hidrofobicidad en proteínas desarrollados por Eisenberg et al., *Proc. Nad. Acad. Sci. EE. UU.* 81: 140-144, 1984; Kyte & Doolittle; *J Molec. Biol.* 157: 105-132, 1981, y Goldman et al., *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 15: 321-353, 1986. Respecto a la estructura primaria y secundaria de los Nanocuerpos, la estructura cristalina de un dominio V_{HH} de una llama se proporciona, por ejemplo, en Desmyter et al., *Nature Structural Biology*, Vol. 3, 9, 803 (1996); Spinelli et al., *Natural Structural Biology* (1996); 3, 752-757; y Decanniere et al., *Structure*, Vol. 7, 4, 361 (1999).

h) Al comparar dos secuencias de aminoácidos, la expresión «diferencia de aminoácidos» se refiere a una inserción, delección o sustitución de un único residuo de aminoácido en una posición de la primera secuencia, en comparación con la segunda secuencia, entendiéndose que dos secuencias de aminoácidos pueden contener una, dos o más diferencias de aminoácidos de este tipo.

i) Cuando se dice que una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos «comprende» otra secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, o que «consta esencialmente de otra secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, esto se puede referir a que esta última secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos se ha incorporado a la primera secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos mencionada, respectivamente, pero más habitualmente esto se refiere, en general, a que la secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos mencionada en primer lugar comprende dentro de su secuencia un segmento de nucleótidos o residuos de aminoácidos, respectivamente, que tiene la misma secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, que la última secuencia, independientemente de cómo se haya generado u obtenido realmente la secuencia mencionada en primer lugar (que puede ser, por ejemplo, por cualquier método adecuado descrito en la presente). Por medio de un ejemplo no limitante, cuando se dice que un dominio variable único de inmunoglobulina biparatópico, por ejemplo, un Nanocuerpo, de la invención comprende una secuencia CDR, esto se puede referir a que dicha secuencia CDR se ha incorporado en el Nanocuerpo biparatópico de la invención, pero más habitualmente esto se refiere, en general, a que el Nanocuerpo biparatópico de la invención contiene dentro de su secuencia un segmento de residuos de aminoácidos con la misma secuencia de aminoácidos que dicha secuencia CDR, independientemente de cómo se haya generado u obtenido dicho Nanocuerpo biparatópico. Cabe destacar también que cuando la última secuencia de aminoácidos tiene una función biológica o estructural específica, tiene de forma preferente esencialmente la misma función estructural o biológica, una similar o una equivalente en la secuencia de aminoácidos mencionada en primer lugar (en otras palabras, la secuencia de aminoácidos mencionada en primer lugar es preferentemente tal que la última secuencia sea capaz de llevar a cabo esencialmente la misma función biológica o estructural, una similar o una equivalente. Por ejemplo, cuando se dice que un Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende una secuencia CDR o una secuencia de marco, respectivamente, la secuencia de CDR y de marco son preferentemente capaces, en dicho Nanocuerpo biparatópico, de funcionar como una secuencia CDR o secuencia de marco, respectivamente. También, cuando se dice que una secuencia de nucleótidos comprende otra secuencia de nucleótidos, la secuencia de nucleótidos mencionada en primer lugar es preferentemente tal que, cuando se expresa en un producto de expresión (p. ej., un polipéptido), la secuencia de aminoácidos codificada por la última

secuencia de nucleótidos forma parte de dicho producto de expresión (dicho de otro modo, que la última secuencia de nucleótidos se encuentra en el mismo marco de lectura que la secuencia de nucleótidos mayor mencionada en primer lugar).

j) Se considera que una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos está «(en forma) esencialmente aislada», por ejemplo, en comparación con su fuente biológica nativa y/o el medio de reacción o medio de cultivo a partir del cual se ha obtenido, cuando se ha separado de al menos un componente diferente con el que se asocia habitualmente en dicha fuente o medio tal como otro ácido nucleico, otra proteína/polipéptido, otro componente biológico o macromolécula o al menos un contaminante, impureza o componente minoritario. En particular, se considera que una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos está «esencialmente aislada» cuando se ha purificado en al menos un factor 2, en particular, al menos un factor 10, más en particular, al menos un factor 100 y hasta un factor 1000 o más. Una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos que se encuentra «en forma esencialmente aislada» es de forma preferente esencialmente homogénea, tal como se determina utilizando una técnica adecuada tal como una técnica cromatográfica adecuada tal como electroforesis en gel de poliacrilamida.

k) La expresión «dominio de unión a antígeno» tal como se utiliza en la presente se refiere a una secuencia de aminoácidos en una inmunoglobulina que comprende al menos una CDR y que tiene una conformación para reconocer un determinante antigénico o epítipo diana.

l) Las expresiones «determinante antigénico» y «epítipo» que también se pueden utilizar indistintamente en la presente, se refieren a una secuencia de aminoácidos dentro del CXCR2 diana que es reconocida por los dominios de unión a antígeno, ya sea en conformación lineal o no lineal.

m) Se dice que un polipéptido de la invención tal como, por ejemplo, un Nanocuerpo biparatópico tal como se describe en la presente o un fragmento de este que se puede unir (específicamente) a un determinante antigénico, epítipo, antígeno o proteína (o al menos una parte, fragmento, o epítipo de esta), que tiene afinidad por ellos y/o que tiene especificidad por ellos es «contra» o está «dirigido contra» dicho determinante antigénico, epítipo, antígeno o proteína.

n) El término «especificidad» se refiere al número de tipos diferentes de antígenos o determinantes antigénicos a los que un dominio de unión a antígeno particular de un polipéptido de la invención se puede unir. La especificidad de una proteína que se une a antígeno para cualquier antígeno/epítipo particular se puede determinar basándose en la afinidad y/o avidez, tal como se describe en las páginas 53-56 del documento WO 08/020079, que también describe algunas técnicas preferidas para medir la unión entre un polipéptido y el antígeno o epítipo pertinente. Habitualmente, en cada proteína de unión a antígeno (tal como los polipéptidos de la invención) cada dominio de unión a antígeno se puede unir cada uno independientemente a su antígeno/epítipo con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos y, preferentemente de 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos y, más preferentemente de 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro (es decir, con una constante de asociación (K_A) de 10^5 a 10^{12} litro/moles o más y, preferentemente, de 10^7 a 10^{12} litro/moles o más y, más preferentemente, de 10^8 a 10^{12} litro/moles). Por lo general se considera que cualquier valor de K_D superior a 10^4 mol/litro (o cualquier valor de K_A inferior a 10^4 M⁻¹) litros/mol indica una unión no específica. Preferentemente, el polipéptido biparatópico de la invención se unirá al antígeno deseado con una afinidad inferior a 500 nM, preferentemente inferior a 200 nM, más preferentemente inferior a 10 nM tal como inferior a 500 pM. La unión específica del polipéptido de la invención a CXCR2 se puede determinar de cualquier manera adecuada conocida por sí misma, que incluye, por ejemplo, el análisis Scatchar y/o ensayos de unión competitiva tales como radioinmunoensayos (RIA, por sus siglas en inglés), inmunoensayos enzimáticos (EIA, por sus siglas en inglés) y ensayos de competición sándwich, y las diferentes variantes de estos conocidas por sí mismas en la técnica, así como las demás técnicas mencionadas en la presente. Como será evidente para el experto y tal como se describe en las páginas 53-56 del documento WO 08/020079, la constante de disociación puede ser la constante de disociación real o aparente. Los métodos para determinar la constante de disociación serán evidentes para el experto y, por ejemplo, incluyen las técnicas mencionadas en las páginas 53-56 del documento WO 08/020079.

o) La semivida de un polipéptido de la invención, en particular, un Nanocuerpo biparatópico de acuerdo con la invención se puede definir, por lo general, como el tiempo necesario para que la concentración sérica del polipéptido de la invención se reduzca en un 50%, *in vivo*, por ejemplo, debido a la degradación del polipéptido y/o la eliminación o la captura del polipéptido por mecanismos naturales. La semivida *in vivo* de un polipéptido de la invención se puede determinar de cualquier manera conocida de por sí, tal como mediante análisis farmacocinético. Las técnicas adecuadas serán evidentes para el experto en la técnica y, por lo general, pueden ser, por ejemplo, tal como se describe en el párrafo o) en la página 57 del documento WO 08/020079. Según se menciona también allí en la página 57 del documento WO 08/020079, la semivida se puede expresar utilizando parámetros tales como el $t_{1/2}$ -alfa, $t_{1/2}$ -beta y el área bajo la curva (AUC). Se hace referencia, por ejemplo, a la Parte Experimental más adelante, así como a los manuales estándar tales como Kenneth, A *et al*: *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists* y Peters *et al*, *Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach* (1996). Se hace también referencia a "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, publicado por Marcel Dekker, 2.^a edición rev. (1982). Las

expresiones «aumento en la semivida» o «semivida aumentada» se refiere a un aumento en el $t_{1/2}$ -beta, ya sea con o sin un aumento en el $t_{1/2}$ -alfa y/o el AUC o ambos.

p) En el contexto de la presente invención, «bloquear, reducir, o inhibir» la actividad de CXCR2 medida utilizando un ensayo *in vitro*, celular o *in vivo* adecuado se puede referir a bloquear, reducir o inhibir la actividad de una actividad biológica relevante o prevista de CXCR2, en al menos un 1%, preferentemente al menos un 5%, tal como al menos un 10% o al menos un 25%, por ejemplo, en al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, o un 90% o más, en comparación con la actividad de CXCR2 en el mismo ensayo en las mismas condiciones, pero sin la presencia del polipéptido de la invención.

Como será evidente para el experto, la inhibición también puede conllevar provocar una disminución en la afinidad, avidez, especificidad y/o selectividad de CXCR2 para uno o más de sus ligandos o parejas de unión y/o provocar una disminución en la sensibilidad de CXCR2 para una o más condiciones en el medio o entorno en el que CXCR2 está presente (tal como pH, fuerza iónica, la presencia de cofactores, etc.), en comparación con las mismas condiciones, pero sin la presencia del polipéptido de la invención. Como será evidente para el experto, esto se puede determinar nuevamente de cualquier manera adecuada y/o utilizando cualquier ensayo adecuado conocido de por sí, en función de la diana o antígeno implicado.

q) Tal como se utiliza en la presente, el término «modular» se puede referir a la modulación alostérica de CXCR2 y/o reducción o inhibición de la unión de CXCR2 a uno de sus ligandos y/o competición con un ligando natural por la unión a CXCR2. La modulación, por ejemplo, puede también conllevar el hecho de provocar una modificación en cuanto al plegamiento o confirmación de CXCR2 o en cuanto a su capacidad de modificar su confirmación (por ejemplo, tras la unión de un ligando), para asociarse con otra u otras (sub)unidades, o para disociarse. La modulación, por ejemplo, puede también conllevar el hecho de provocar una modificación en la capacidad de CXCR2 para transportar otros compuestos o para servir como canal para otros compuestos (tales como iones). La modulación, en particular, la inhibición o reducción de la actividad de CXCR2 por parte de los polipéptidos de la invención, en particular, los Nanocuerpos biparatómicos de la invención puede ser reversible o irreversible, pero para fines farmacéuticos y farmacológicos será habitualmente de una forma reversible.

r) Se dice que un polipéptido de la invención es «específico para» CXCR2 en comparación con una segunda diana o antígeno cuando se une a CXCR2 con una afinidad (tal como se ha descrito anteriormente y, expresada de forma adecuada como un valor de K_D , un valor de K_A , una velocidad K_d y/o una velocidad K_a) que es al menos 10 veces tal como al menos 100 veces, y preferentemente al menos 1000 veces y hasta 10 000 veces o más la afinidad con la cual se une a una segunda diana o polipéptido. Por ejemplo, el polipéptido de la invención se puede unir a CXCR2 con un valor de K_D que es al menos 10 veces inferior tal como al menos 100 veces inferior y, preferentemente, al menos 1000 veces inferior tal como 10 000 veces inferior o incluso inferior a ese, que la K_D con la cual se une a otra diana o polipéptido o epítipo de esta.

s) Las expresiones «bloqueo cruzado», «bloqueado de forma cruzada» y «que bloquea de forma cruzada» se utilizan indistintamente en la presente para referirse a la capacidad de un polipéptido o dominio variable único de inmunoglobulina para interferir con la unión de otros polipéptidos o dominios variables únicos de inmunoglobulina de la invención a una diana determinada. El grado hasta el que un polipéptido o dominio variable único de inmunoglobulina de la invención puede interferir con la unión de otra diana y, por tanto, se puede decir que bloquea de forma cruzada de acuerdo con la invención, se puede determinar utilizando ensayos de unión competitiva. Un ensayo de bloqueo cruzado cuantitativo particularmente adecuado utiliza una estrategia basada en FACS, o ELISA, para medir la competición entre el polipéptido o dominio variable único de inmunoglobulina marcado (p. ej., etiquetado con His, marcado con radiactividad o fluorescencia) de acuerdo con la invención y el otro agente de unión en términos de su unión a la diana. La parte experimental describe de forma general un ensayo basado en desplazamiento de ELISA y FACS adecuado para determinar si una molécula de unión bloquea de forma cruzada o es capaz de bloquear de forma cruzada un polipéptido o dominio variable único de inmunoglobulina de acuerdo con la invención. Se apreciará que el ensayo se puede utilizar con cualquiera de los dominios variables únicos de inmunoglobulina u otros agentes de unión descritos en la presente. Por tanto, en general, una secuencia de aminoácidos u otro agente de unión que bloquea de forma cruzada de acuerdo con la invención es uno que se unirá a la diana en el ensayo de bloqueo cruzado anterior de modo que, durante el ensayo y en presencia de una segunda secuencia de aminoácidos u otro agente de unión de la invención, el desplazamiento registrado del polipéptido o dominio variable único de inmunoglobulina de acuerdo con la invención sea de entre un 50% y un 100% del desplazamiento teórico máximo por el agente que potencialmente bloquea de forma cruzada a evaluar (p. ej., otro fragmento de anticuerpo, V_{HH} , dAb o variante de V_H/V_L similar).

t) Se dice que un polipéptido de acuerdo con la invención es «reactivo de forma cruzada» para dos antígenos o determinantes antigénicos diferentes (tales como seroalbúmina o CXCR2 de dos especies diferentes de mamífero tales como ser humano y macaco cinomolgo) si este es específico para (tal como se ha definido en la presente) estos dos antígenos o determinantes antigénicos diferentes.

u) Tal como se define en la presente, la expresión modificaciones de aminoácidos conservativas se refiere a sustituciones de aminoácidos en las que un residuo de aminoácido se reemplaza por otro residuo de aminoácido

de estructura química similar y que tiene poca influencia o una influencia esencialmente nula en la función, actividad u otras propiedades biológicas del polipéptido. Dichas sustituciones de aminoácidos conservativas son muy conocidas en la técnica, por ejemplo, a partir de los documentos WO 04/037999, GB-A-3 357 768, WO 98/49185, WO 00/46383 y WO 01/09300; y se pueden seleccionar tipos y/o combinaciones de dichas sustituciones (preferidos) basándose en las descripciones pertinentes del documento WO 04/037999, así como el documento WO 98/49185 y a partir de las referencias adicionales citadas allí.

Dichas sustituciones conservativas son preferentemente sustituciones en las que un aminoácido dentro de los siguientes grupos (a) - (e) se sustituye con otro residuo de aminoácido dentro del mismo grupo: (a) residuos alifáticos, no polares o ligeramente polares de pequeño tamaño: Ala, Ser, Thr, Pro y Gly; (b) residuos polares, cargados negativamente y sus amidas (no cargadas): Asp, Asn, Glu y Gln; (c) residuos polares, cargados positivamente: His, Arg y Lys; (d) residuos alifáticos, no polares de gran tamaño: Met, Leu, He, Val y Cys; y (e) residuos aromáticos: Phe, Tyr y Trp.

Algunas sustituciones conservativas particularmente preferidas son las siguientes: Ala por Gly o por Ser; Arg por Lys; Asn por Gln o por His; Asp por Glu; Cys por Ser; Gln por Asn; Glu por Asp; Gly por Ala o por Pro; His por Asn o por Gln; He por Leu o por Val; Leu por He o por Val; Lys por Arg, por Gln o por Glu; Met por Leu, por Tyr o por He; Phe por Met, por Leu o por Tyr; Ser por Thr; Thr por Ser; Trp por Tyr; Tyr por Trp; y/o Phe por Val, por He o por Leu.

v) Tal como se utiliza en la presente, una CDR es una región determinante de la complementariedad de los polipéptidos de la invención. Una CDR es un segmento de aminoácidos que solo o combinado con una o más CDR diferentes establece la complementariedad con el o los antígenos o el o los epítomos que el polipéptido de la invención reconoce. Las CDR se identifican en las secuencias de aminoácidos con determinadas convenciones de numeración. En cuanto a las reivindicaciones y la descripción específica en la presente, se utiliza la numeración de Kabat.

w) Tal como se utiliza en la presente, FR es una región de marco (en ocasiones denominada una FW). Las regiones de marco son segmentos de aminoácidos que flanquean la o las CDR y las mantienen en la conformación tridimensional correcta para el reconocimiento de antígenos o epítomos. Las FR no son específicas para el antígeno o epítomo diana, pero son específicas para el origen de especie o tipo de moléculas de inmunoglobulina en las que están presentes. Tal como se discute en detalle en la presente, en los polipéptidos de la invención hay cabida para que las secuencias de aminoácidos de la región de marco se modifiquen para que sean diferentes a la secuencia de marco aplicada por la fuente de la inmunoglobulina, p. ej., Camélido.

x) Tal como se utiliza en la presente, CXCR2 se refiere a un receptor de citocinas presente al menos en la superficie de los leucocitos y para el cual el ligando de origen natural puede ser Gro- α , β , γ , IL-8, ENA-78 o GCP-2. CXCR2 se refiere en general a cualquier proteína que presenta función CXCR2 independientemente de la especie de origen. Sin embargo, tal como se utiliza en la presente, CXCR2 humano se refiere a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 1 o cualquier variante alélica u ortólogo de esta y CXCR2 cinomolgo se refiere a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 3 o cualquier variante alélica u ortólogo de esta.

y) Tal como se utiliza en la presente «optimización de secuencia» se refiere al hecho de favorecer sustituciones, inserciones o deleciones en una secuencia de aminoácidos a efectos de conseguir propiedades o características estructurales particulares que pueden no estar presentes en la secuencia nativa. Dichas sustituciones, inserciones o deleciones se pueden llevar a cabo, por ejemplo, a efectos estabilización química, para obtener mejoras en la capacidad de fabricación, para evitar la formación de piroglutamato u oxidación o isomerización. Algunos métodos para lograr la optimización de dichas propiedades que se pueden emplear para los polipéptidos biparatópicos, en particular, Nanocuerpos biparatópicos de la invención se describen en el documento WO 2009/095235. Se pueden llevar a cabo técnicas de optimización de secuencias también a efectos de humanizar un polipéptido biparatópico de la invención de una manera tal como se describe en la presente. Por tanto, allí donde se utilizan las expresiones optimización de secuencias, optimizar secuencias o con secuencia optimizada en la presente, esto engloba la referencia específica a sustituciones o inserciones humanizantes y a polipéptidos biparatópicos parcial o totalmente humanizados, preferentemente Nanocuerpos biparatópicos.

Descripción detallada de la invención

Tal como se ha mencionado anteriormente, en su primer aspecto la invención proporciona un polipéptido que comprende al menos dos dominios de unión a antígeno de inmunoglobulina, donde el polipéptido se dirige contra el receptor de quimiocinas CXCR2 o se une a él, donde dicho polipéptido incluye un primer dominio de unión a antígeno que reconoce un primer epítomo en CXCR2 y un segundo dominio de unión a antígeno que reconoce un segundo epítomo en CXCR2.

Un polipéptido de la invención preferido comprende un primer dominio de unión a antígeno que es capaz de unirse a un péptido lineal compuesto por la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 7 y un segundo dominio de unión a antígeno que se une a un epítomo dentro de los bucles externos de CXCR2 humano (residuos de aminoácidos

106-120, 184-208 y 274-294 de la SEQ ID N.º 1). La SEQ ID N.º 7 son los primeros 19 aminoácidos N terminales de CXCR2 humano.

El primer y segundo dominios de unión a antígeno pueden estar comprendidos en una o más secuencias de aminoácidos características de una molécula de la clase de las inmunoglobulinas. Por ejemplo, esos péptidos o polipéptidos pueden comprender cada uno un anticuerpo tetracatenario convencional unido mediante un conector. En particular, el polipéptido de la invención puede ser uno en el que dichos primer y segundo dominios de unión a antígeno están comprendidos en el primer y segundo anticuerpos, respectivamente, comprendiendo cada uno dos cadenas pesadas y dos ligeras y en el que dichos primero y segundo anticuerpos están unidos mediante un conector. Como alternativa, dichos primer y segundo dominios de unión a antígeno pueden estar comprendidos dentro de un anticuerpo único que comprende dos cadenas pesadas y dos ligeras.

En una realización alternativa de la invención, el primer y segundo dominios de unión a antígeno están comprendidos dentro de secuencias de aminoácidos que son anticuerpos de cadena pesada y, en particular, el polipéptido de la invención puede ser uno en el que dicho primer dominio de unión a antígeno está comprendido dentro de un primer anticuerpo de cadena pesada y dicho segundo dominio de unión a antígeno está comprendido dentro de un segundo anticuerpo de cadena pesada donde dichos primer y segundo anticuerpos de cadena pesada están unidos mediante un conector. Dichos anticuerpos de cadena pesada se pueden obtener a partir de la familia de los Camélidos y comprenden, en la naturaleza, solamente dos cadenas pesadas, cada una con una región constante y una variable. Un polipéptido en el que dichos primer y segundo dominios de unión están comprendidos dentro de un único anticuerpo de cadena pesada que comprende dos cadenas pesadas también se contempla en la invención.

En otra realización alternativa de los péptidos o polipéptidos que comprenden el primer y segundo dominios de unión puede ser un Fv monocatenario (scFv). Estos comprenden una fusión lineal de un dominio V_L y V_H . Por consiguiente, el polipéptido de la invención puede ser uno donde dichos primer y segundo dominios de unión a antígeno están comprendidos dentro de los fragmentos Fv monocatenarios (scFv) del primer y segundo anticuerpos respectivamente y donde dichos primer y segundo fragmentos scFv están unidos mediante un conector.

En una alternativa adicional el primer y segundo dominios de unión a antígeno pueden estar comprendidos en uno o más fragmentos Fab o F(ab)2 de un anticuerpo tetracatenario convencional. Un fragmento Fab comprende un dominio constante y un dominio variable de cada una de la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo convencional. Un fragmento F(ab)2 comprende dos fragmentos Fab unidos por una parte de la región bisagra de un anticuerpo convencional. En particular, el polipéptido de la invención puede ser uno en el que dichos primer y segundo dominios de unión a antígeno están comprendidos dentro de un primer y segundo fragmentos Fab o F(ab)2 de anticuerpo, respectivamente, y en el que dichos primer y segundo fragmentos Fab o F(ab)2 están unidos mediante un conector. En una realización de este tipo, dicho primer dominio de unión a antígeno puede estar comprendido dentro de un fragmento Fab de anticuerpo y dicho segundo dominio de unión a antígeno está comprendido dentro de un fragmento F(ab)2 o viceversa.

El primer dominio de unión a antígeno está comprendido dentro de un primer dominio variable único de inmunoglobulina y dicho segundo dominio de unión a antígeno está comprendido dentro de un segundo dominio variable único de inmunoglobulina.

Un ejemplo particular de esta realización de la invención es aquel en el que el primer y segundo dominios de unión a antígeno están comprendidos en un anticuerpo de dominio denominado un d(ab). Los d(ab) comprenden dominios V_L o V_H únicos de anticuerpos convencionales. Por tanto, el polipéptido de la invención puede ser uno en el que dichos primer y segundo dominios de unión a antígeno están comprendidos dentro de un primer y segundo anticuerpos de dominio (dAb) y en el que dichos primer y segundo dAb están unidos mediante un conector. Dichos primer y segundo dAb pueden ser fragmentos V_L de anticuerpo o fragmentos V_H de anticuerpo. En una realización de este tipo dicho primer dominio de unión a antígeno puede estar comprendido en un fragmento V_L y dicho segundo dominio de unión a antígeno puede estar comprendido en un fragmento V_H o viceversa.

Para una descripción general de anticuerpos de dominio (único) también se hace referencia al documento EP 0 368 684. Para el término "dAb", se hace referencia, por ejemplo, a Ward *et al.* (*Nature* 12 de oct. de 1989; 341 (6242): 544-6), a Holt *et al.*, *Trends Biotechnol.*, 2003, 21(11):484-490; así como, por ejemplo, a los documentos WO 06/030220, WO 06/003388 y otras solicitudes de patente publicadas de Domantis Ltd. Cabe destacar también que, aunque menos preferidos en el contexto de la presente invención debido a que no son de origen mamífero, se pueden obtener anticuerpos de dominio único o dominios variables únicos de determinadas especies de tiburón (por ejemplo, los denominados «dominios IgNAR», remítase, por ejemplo, al documento WO 05/18629).

La región variable de una cadena única de un anticuerpo de cadena pesada de este tipo 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} completo o un fragmento de este. Para una descripción general de anticuerpos de cadena pesada y sus dominios variables se hace referencia a la técnica anterior mencionada en la página 59 del documento WO08/020079 y a la lista de referencias mencionadas en las páginas 41 a 43 de la Solicitud Internacional WO06/040153. Los

dominios V_{HH} poseen una serie de características estructuras y propiedades funcionales únicas que hacen a los dominios V_{HH} aislados (así como los Nanocuerpos basados en ellos con las mismas características estructurales y funcionales que los dominios V_{HH} de origen natural) y a los polipéptidos que los contienen muy convenientes como polipéptidos o dominios de unión a antígeno funcionales. En particular, los dominios V_{HH} (que han sido «diseñados» por la naturaleza para unirse de forma funcional a un antígeno sin la presencia o sin ninguna interacción con un dominio variable de cadena ligera) y los Nanocuerpos pueden actuar como una única proteína, dominio o unidad estructural de unión a antígeno funcional de tamaño relativamente pequeño. Tal como se utiliza en la presente, el término Nanocuerpo engloba no solamente dominios V_{HH} de origen natural y fragmentos de estos, sino variantes y derivados de estos tal como se discuten en detalle en la presente.

En la realización más preferida de la invención, el polipéptido biparatópico de la invención es uno en el que dicho primer dominio de unión a antígeno está comprendido dentro de un primer Nanocuerpo y dicho segundo dominio de unión a antígeno está comprendido dentro de un segundo Nanocuerpo y dichos primer y segundo Nanocuerpos están unidos mediante un conector.

La estructura del dominio V_{HH} se puede representar como:

FR-CDR-FR-CDR-FR-CDR-FR

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

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

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

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

donde si FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 comprende el primer dominio de unión a antígeno (ligante de SEQ ID N.º 7 lineal), entonces FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 comprende el segundo dominio antigénico (no ligante de SEQ ID N.º 7 lineal) y si FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 comprende el segundo dominio antigénico (no ligante de SEQ ID N.º 7 lineal), entonces FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 comprende el primer dominio de unión a antígeno (ligante de SEQ ID N.º 7 lineal) y el HLE es una unidad de unión que proporciona una semivida *in vivo* mayor.

Por consiguiente, tal como se utiliza en la presente «Nanocuerpo biparatópico de acuerdo con la invención» se refiere a un polipéptido que comprende dos Nanocuerpos únicos unidos mediante un conector.

Sin embargo, los Nanocuerpos biparatópicos de la invención pueden incluir solamente una CDR en cada Nanocuerpo. En ese caso, la CDR preferida es CDR3 y/o CDR6. Los Nanocuerpos biparatópicos de acuerdo con la invención pueden incluir, sin embargo, 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. Tal como se ha indicado anteriormente, el Nanocuerpo biparatópico de la invención puede comprender todas las CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 y CDR6, estando cada CDR flanqueada por una FR.

Las FR pueden tener secuencias de aminoácidos coherentes con la fuente de Camélido. Sin embargo, en realizaciones preferidas, una o más de las FR tienen al menos una sustitución de aminoácido de optimización de secuencia y, preferentemente, uno o más y, más preferentemente, todas, las FR están parcial o totalmente humanizadas. Las sustituciones para la optimización de secuencia se discuten en más detalle a continuación.

También se menciona en la presente que en las realizaciones de la invención en las que el primer y segundo dominios de unión a antígeno están comprendidos en el primer y segundo dominios variables únicos de inmunoglobulina que no son Nanocuerpos, sino en dominios o fragmentos de anticuerpos convencionales tal como se ha discutido anteriormente, por ejemplo, anticuerpos, dominios o fragmentos humanos, es posible modificar las CDR en él con al menos una sustitución camelizante y, opcionalmente, generar CDR totalmente camelizadas.

Tal como se describe adicionalmente en la presente, el número total de residuos de aminoácidos en un Nanocuerpo único puede estar en la región de 110-120, es preferentemente 112-115, y es de la forma más preferida 113. Sin embargo, cabe destacar que las partes, fragmentos, análogos o derivados (tal como se describen adicionalmente en la presente) de un Nanocuerpo no están particularmente limitadas en cuanto a su longitud y/o tamaño, siempre que dichas partes, fragmentos, análogos o derivados satisfagan los requisitos adicionales expuestos en la presente y sean también preferentemente adecuadas para los fines descritos en la presente.

Tal como se describe en más detalle en la presente, los residuos de aminoácidos de un Nanocuerpo se numeran de acuerdo con la numeración general para los dominios V_H proporcionada por Kabat *et al.* ("Sequence of proteins of

immunological interest", Servicios de Salud Pública de EE. UU., NIH Bethesda, MD, N.º de publicación 91), tal como se aplica a los dominios V_{HH} de Camélidos en el artículo de Riechmann y Muyldermans, *J. Immunol. Methods*, 23 de junio de 2000; 240 (1-2): 185-195 (remítase, por ejemplo, a la Figura 2 de esta publicación), y, por consiguiente, 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 la 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 FR y CDR en las posiciones proporcionadas 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 CDR y las FR en un anticuerpo y, en particular, un Nanocuerpo, se pueden identificar mediante sistemas de numeración alternativos a Kabat. Estos incluyen los sistemas Chothia, IMGT y AHo. La identificación de las posiciones de las CDR o FR 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 alternativa se pueden lograr mediante análisis de las secuencias. Con este fin, se puede hacer referencia a las siguientes páginas web: <http://www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/> (Chothia); <http://imgt.cines.fr> (IMGT) y <http://www.bio.uzh.ch/antibody/index.html> (AHo). De forma específica, en los Nanocuerpos biparatópicos preferidos de la invención descritos en la presente, las CDR 1, 2, 3, 4, 5 o 6 se pueden definir con uno de estos sistemas de numeración alternativos a Kabat, pero estarán aún dentro del alcance de la invención.

Las CDR de Chothia para algunos nanocuerpos de acuerdo con la invención se muestran en la Tabla 35.

Los Nanocuerpos pueden ser de la denominada «clase V_{H3}» (es decir, Nanocuerpos con un grado elevado de homología de secuencia respecto a las secuencias germinales humanas 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, cabe destacar que cualquier tipo de Nanocuerpo dirigido contra CXCR2 y, por ejemplo, los Nanocuerpos que pertenecen a la denominada «clase V_{H4}» (es decir, Nanocuerpos con un grado elevado de homología de secuencia respecto a las secuencias de la línea germinal humana de la clase V_{H4} tales como DP-78), tal como se describen, por ejemplo, en el documento WO 07/118670, se pueden utilizar en la construcción de los Nanocuerpos biparatópicos de la invención.

La molécula conectora que une dichos uno o más péptidos o polipéptidos que comprenden el primer y segundo dominios de unión a antígeno de acuerdo con la invención puede ser o no de origen inmunoglobulínico. Cuando el polipéptido de la invención es un dominio variable único de inmunoglobulina biparatópico, por ejemplo, un Nanocuerpo, el conector une el extremo C terminal de un dominio variable único de inmunoglobulina que comprende un dominio de unión a antígeno con el extremo N terminal de otro dominio variable único de inmunoglobulina que comprende un dominio de unión a antígeno.

Los espaciadores o conectores adecuados para su uso en los polipéptidos biparatópicos de la invención con el fin de unir el primer y segundo dominios de unión a antígeno entre sí, en particular, los dos Nanocuerpos entre sí, serán evidentes para el experto y, en general, pueden ser cualquier conector o espaciador utilizado en la técnica para conectar secuencias de aminoácidos. Preferentemente, dicho conector o espaciador es adecuado para su uso en la construcción de proteínas o polipéptidos que estén destinados a un uso farmacéutico.

Por ejemplo, un conector puede ser una secuencia de aminoácidos adecuada y, en particular, secuencias de aminoácidos de entre 1 y 50, preferentemente de entre 1 y 30, tal como entre 1 y 10 residuos de aminoácidos. Algunos ejemplos preferidos de dichas secuencias de aminoácidos incluyen conectores de gly-ser, por ejemplo, del tipo (gly_xser)_z, tal como (por ejemplo, (gly₄ser)₃ o (gly₃ser₂)₃), tal como se describe en el documento WO 99/42077 y los conectores GS30, GS15, GS9 y GS7 descritos en las solicitudes de Ablynx mencionadas en la presente (remítase, por ejemplo, a los documentos WO 06/040153 y WO 06/122825), así como las regiones de tipo bisagra tales como las regiones de bisagra de anticuerpos de cadena pesada de origen natural o secuencias similares (tales como las descritas en el documento WO 94/04678).

Algunos posibles conectores diferentes son polialanina (tal como AAA), así como los conectores GS30 (SEQ ID N.º: 85 en el documento WO 06/122825) y GS9 (SEQ ID N.º: 84 en el documento WO 06/122825).

5

GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID No 220).

10

15

20

25

respectives épitopes en EXON2.

30

40

45

50

Los inventores de la presente han preparado polipéptidos biparatópicos de acuerdo con la invención. Las secuencias de aminoácidos de los Nanocuerpos anti-CXCR2 multivalentes y biparatópicos se muestran en la Tabla 13 entre los Ejemplos de la presente. De estos, algunos polipéptidos de acuerdo con la invención particularmente preferidos 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, 54B12-163E3, 163D2-2B2 y 163E3-2B2 así como 127D1-97A9, 54B12-97A9 y 97A9-127D1 y las variantes con secuencia optimizada de estos. Todos estos Nanocuerpos biparatópicos comprenden un primer Nanocuerpo que comprende un primer dominio de unión a antígeno que es capaz de unirse a un péptido lineal compuesto por la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 7 (aminoácidos 1-19 de CXCR2) y un segundo Nanocuerpo que comprende un segundo dominio de unión a antígeno que o bien no es capaz de unirse o bien se une con una afinidad inferior a dicho péptido lineal (remítase a la Tabla 8). Se prefieren particularmente, de acuerdo con la invención, 163D2-127D1, 163E3-127D1, 163E3-54B12, 163D2-54B12, 2B2-163E3, 2B2-163D2, 97A9-2B2 y 97A9-54B12.

1) 163D2-127D1 (SEQ ID No 58)

Esta realización de la invención se refiere a un Nanocuerpo biparatópico donde dicho segundo Nanocuerpo tal como se define anteriormente incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 145, 165 y 185 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 145, 165 o 185 y donde dicho primer Nanocuerpo incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 141, 161 y 181 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 141, 161 o 181.

Preferentemente, el Nanocuerpo biparatópico comprende la estructura:

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

donde en dicho segundo Nanocuerpo la CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 145, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 165 y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 185 y donde en dicho primer Nanocuerpo la CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 141, la CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 161 y la CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 181 o en la que las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, o al menos un 85% o al menos un 90% o al menos un 95 % de identidad de la secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.ºs 145, 165, 185, 141, 161 o 181.

Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 145, 165, 185, 141, 161 o 181 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de cualquiera de las ID de secuencias anteriores solamente en uno, dos o tres aminoácidos.

En una realización preferida de este aspecto de la invención la FR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 83, la FR2 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 104, la FR3 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 124, la FR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 131, la FR5 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 79, la FR6 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 100, la FR7 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 120 y/o la FR8 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 131.

Como alternativa, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 y FR8 pueden tener secuencias de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 83, 104, 124, 131, 79, 100 o 120.

Por ejemplo, en este aspecto de la invención, FR1 y/o FR4 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 70 a 89, FR2 y/o FR5 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 91 a 110, FR3 y/o FR6 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 111 a 130 y FR4 y/o FR8 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 131 a 133.

En una realización particularmente preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 58 o un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 58.

En otra realización de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 58 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 58 o al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las regiones de marco de esta de acuerdo con la numeración de Kabat, donde el Nanocuerpo biparatópico puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una CI_{50} inferior a 20nM.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende sustancialmente las secuencias CDR expuestas en la SEQ ID N.º 58, pero modificadas en las regiones de marco para incluir una o más sustituciones de optimización de secuencia, preferentemente una o más de las identificadas como adecuadas en la Tabla 28 para el Nanocuerpo 163D2 y en la Tabla 26 para el Nanocuerpo 127D1. Preferentemente, el Nanocuerpo 163D2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 218 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 218 y el Nanocuerpo 127D1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 216 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 216. Por ejemplo, las regiones de marco de estos Nanocuerpos pueden tener la secuencia de las regiones de marco FR1, FR2, FR3 o FR4 de acuerdo con la numeración de Kabat que se muestran en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 213 a 219 en la Tabla 32. Preferentemente, un Nanocuerpo biparatópico con secuencia optimizada de este tipo puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una CI_{50} inferior a 20nM.

2) 163E3-127D1 (SEQ ID No 59)

Esta realización de la invención se refiere a un Nanocuerpo biparatópico donde dicho segundo Nanocuerpo incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 146, 166 y 186 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 146, 166 o 186 y donde dicho primer Nanocuerpo incluye al menos una CDR seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 141, 161 y 181 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 141, 161 o 181.

Preferentemente, el Nanocuerpo biparatópico comprende la estructura:

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

donde en dicho segundo Nanocuerpo la CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 146, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 166 y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 186 y donde en dicho primer Nanocuerpo, la CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 141, la CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 161 y la CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 181 o las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.ºs 146, 166, 186, 141, 161 o 181.

Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las expuestas en las SEQ ID N.ºs 146, 166, 186, 141, 161 o 181 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de cualquiera de las ID de secuencias anteriores solamente en uno, dos o tres aminoácidos.

En una realización preferida este aspecto de la invención, FR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 84, FR2 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 105, FR3 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 125, FR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 131, FR5 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 79, FR6 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 100, FR7 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 120 y/o FR8 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 131.

Como alternativa, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 y FR8 pueden tener secuencias de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de aminoácidos, o al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 84, 105, 125, 131, 79, 100 o 120.

Por ejemplo, en este aspecto de la invención, FR1 y/o FR4 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 70 a 89, FR2 y/o FR5 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 91 a 110, FR3 y/o FR6 pueden comprender la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 111 a 130 y FR4 y/o FR8 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 131 a 133.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 59 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos o al menos un 85%, o al menos un 90%, o al menos un 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 59.

- 5 En una realización de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 59 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con la SEQ ID 59, o al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las regiones de marco de esta de acuerdo con la numeración de Kabat, donde el Nanocuerpo biparatópico puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una Cl_{50} inferior a 20 nM.
- 10 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende sustancialmente las secuencias CDR expuestas en la SEQ ID N.º 59, pero modificadas en las regiones de marco para incluir una o más sustituciones de optimización de secuencia, preferentemente una o más de las identificadas como adecuadas en la Tabla 24 para el Nanocuerpo 163E3 y en la Tabla 26 para el Nanocuerpo 127D1. Preferentemente,
- 15 el Nanocuerpo 163E3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 217 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 217 y el Nanocuerpo 127D1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 216 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 216. Por ejemplo,
- 20 las regiones de marco de estos Nanocuerpos pueden tener la secuencia de las regiones de marco FR1, FR2, FR3 o FR4 de acuerdo con la numeración de Kabat que se muestran en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 213 a 219 en la Tabla 32. Preferentemente, un Nanocuerpo biparatópico con secuencia optimizada de este tipo puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una Cl_{50} inferior a 20nM.

3) 163E3/54B12 (SEQ ID No 62)

- 25 Esta realización de la invención se refiere a un Nanocuerpo biparatópico donde dicho segundo Nanocuerpo incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 146, 166 y 186 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 146, 166 o 186 y donde dicho primer Nanocuerpo incluye al menos una CDR seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 151, 171 y 191 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con las secuencias de
- 30 aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 151, 171 o 191.

Preferentemente, el Nanocuerpo biparatópico comprende la estructura:

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

- 35 donde en dicho segundo Nanocuerpo CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 146, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 166 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 186 y donde en dicho primer Nanocuerpo CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 151, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 171 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 191 o donde CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80% de identidad de aminoácidos, preferentemente al menos un 85% o al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos
- 40 con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.ºs 146, 166, 186, 151, 171 o 191.

Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las expuestas en las SEQ ID N.ºs 146, 166, 186, 151, 171, 191 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de cualquiera de las ID de secuencias anteriores solamente en uno, dos o tres aminoácidos.

- 45 De acuerdo con este aspecto de la invención FR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 84, FR2 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 105, FR3 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 125, FR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 131, FR5 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 89, FR6 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 110, FR7 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 130 y/o FR8 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 131.
- 50

Como alternativa, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 y FR8 tienen secuencias de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de aminoácidos, o al menos un 85% o al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 84, 105, 125, 131, 89, 110 o 130.

- 55 Por ejemplo, en este aspecto de la invención, FR1 y/o FR4 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 70 a 89, FR2 y/o FR5 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta

en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 91 a 110, FR3 y/o FR6 pueden comprender la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 111 a 130 y FR4 y/o FR8 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 131 a 133.

5 En una realización preferida, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 62 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.^o 62.

10 En una realización preferida, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 62 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos respecto a la SEQ ID N.^o 62 o al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las regiones de marco de esta de acuerdo con la numeración de Kabat, donde el Nanocuerpo biparatópico puede inhibir la unión de GRO- α a CXCR2 humano con una Cl_{50} inferior a 20nM.

15 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende sustancialmente las secuencias CDR expuestas en la SEQ ID N.^o 62, pero modificadas en las regiones de marco para incluir una o más sustituciones de optimización de secuencia, preferentemente una o más de las identificadas como adecuadas en la Tabla 24 para el Nanocuerpo 163E3 y en la Tabla 30 para el Nanocuerpo 51B12. Preferentemente, el Nanocuerpo 163E3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 217 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.^o 217 y el Nanocuerpo 54B12 comprende la secuencia de aminoácidos
20 expuesta en la SEQ ID N.^o 219 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.^o 219. Por ejemplo, las regiones de marco de estos Nanocuerpos pueden tener la secuencia de las regiones de marco FR1, FR2, FR3 o FR4 de acuerdo con la numeración de Kabat que se muestran en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 212 a 219 en Tabla 32. Preferentemente, un Nanocuerpo biparatópico con secuencia optimizada de este tipo puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una Cl_{50} inferior a 20nM.
25

4) 163D2/54B12 (SEQ ID No 63)

Esta realización de la invención se refiere a un Nanocuerpo biparatópico donde dicho segundo Nanocuerpo incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.^{os} 145, 165 y 185 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia
30 de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.^{os} 145, 165 o 185 y donde dicho primer Nanocuerpo incluye al menos una CDR seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.^{os} 151, 171 y 191 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.^{os} 151, 171 o 191.

Preferentemente, el Nanocuerpo biparatópico comprende la estructura:
35 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--CONECTOR--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8
donde en dicho primer Nanocuerpo CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 145, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 165 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 185 y donde en dicho segundo Nanocuerpo CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 151, CDR5 comprende la secuencia de
40 aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 171 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 191 o donde CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80%, preferentemente al menos un 85%, o al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.^o 145, 165, 185, 151, 171 o 191.

45 Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las expuestas en las SEQ ID N.^{os} 145, 165, 185, 151, 171 o 191 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las de cualquiera de las ID de secuencia anteriores solamente en uno, dos o tres aminoácidos.

De acuerdo con este aspecto de la invención FR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 83, FR2 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 104, FR3
50 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 124, FR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 131, FR5 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 89, FR6 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 110, FR7 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 130 y/o FR8 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 131.

55 Como alternativa, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 y FR8 pueden tener secuencias de aminoácidos con al menos un 80%, al menos un 85% al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de aminoácidos con las secuencias de

aminoácidos expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 83, 104, 124, 131, 89, 110 o 130.

Por ejemplo, en este aspecto de la invención, FR1 y/o FR4 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 70 a 89, FR2 y/o FR5 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 91 a 110, FR3 y/o FR6 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 111 a 130 y FR4 y/o FR8 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 131 a 133.

En una realización preferida, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 63 o un polipéptido que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.^o 63.

En una realización preferida, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 63 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID N.^o 63, o al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las regiones de marco de acuerdo con la numeración de Kabat, donde el Nanocuerpo biparatópico puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 2.0E-09M.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende sustancialmente las secuencias CDR expuestas en la SEQ ID N.^o 63, pero modificadas en las regiones de marco para incluir una o más sustituciones de optimización de secuencia, preferentemente una o más de las identificadas como adecuadas en la Tabla 28 para el Nanocuerpo 163D2 y en la Tabla 30 para el Nanocuerpo 54B12. Preferentemente, el Nanocuerpo 163D2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 218 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.^o 218 y el Nanocuerpo 54B12 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 219 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.^o 219. Por ejemplo, las regiones de marco de estos Nanocuerpos pueden tener la secuencia de las regiones de marco FR1, FR2, FR3 o FR4 de acuerdo con la numeración de Kabat que se muestran en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 213 a 219 en la Tabla 32. Preferentemente, un Nanocuerpo biparatópico con secuencia optimizada de este tipo puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

5) 2B2/163E3 (SEQ ID No 64)

Esta realización de la invención se refiere a un Nanocuerpo biparatópico, donde dicho primer Nanocuerpo incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.^{os} 147, 167 y 187 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.^{os} 147, 167 o 187 y donde dicho segundo Nanocuerpo incluye al menos una CDR seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.^{os} 146, 166 y 186 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.^{os} 146, 166 o 186.

Preferentemente, el Nanocuerpo biparatópico comprende la estructura:

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

donde en dicho primer Nanocuerpo CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 147, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 167 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 187 y donde en dicho segundo Nanocuerpo CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 146, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 166 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 186, o donde CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80%, preferentemente al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.^{os} 147, 167, 187, 146, 166 o 186.

Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las expuestas en las SEQ ID N.^{os} 147, 167, 187, 146, 166 o 186 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las de cualquiera de las ID de secuencia anteriores solamente en uno, dos o tres aminoácidos.

De acuerdo con el aspecto de la invención, FR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 85, FR2 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 106, FR3 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 126, FR4 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 131, FR5 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 84, FR6 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 105, FR7 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 125 y/o FR8 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 131.

Como alternativa, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 y FR8 tienen secuencias de aminoácidos con al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 85, 106, 126, 131, 84, 105 o 125.

Por ejemplo, en este aspecto de la invención, FR1 y/o FR4 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 70 a 89, FR2 y/o FR5 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 91 a 110, FR3 y/o FR6 pueden comprender la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 111 a 130 y FR4 y/o FR8 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 131 a 133.

En una realización preferida, el Nanocuerpo biparatópico de acuerdo con la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 64 o un polipéptido que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 64.

Una realización preferida del Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 64 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID N.º 64, o al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las regiones de marco de esta de acuerdo con la numeración de Kabat, donde el Nanocuerpo biparatópico puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende sustancialmente las secuencias CDR expuestas en la SEQ ID N.º 64, pero modificadas en las regiones de marco para incluir una o más sustituciones de optimización de secuencia, preferentemente una o más de las identificadas como adecuadas en la Tabla 20 para el Nanocuerpo 2B2 y en la Tabla 24 para el Nanocuerpo 163E2. Preferentemente, el Nanocuerpo 2B2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 213 o 214 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 213 o 214 y el Nanocuerpo 163E3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 217 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 217. Por ejemplo, las regiones de marco de estos Nanocuerpos pueden tener la secuencia de las regiones de marco FR1, FR2, FR3 o FR4 de acuerdo con la numeración de Kabat que se muestran en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 213 a 219 en la Tabla 32. Preferentemente, un Nanocuerpo biparatópico con secuencia optimizada de este tipo puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

6) 2B2/163D2 (SEQ ID No 65)

Esta realización de la invención se refiere a un Nanocuerpo biparatópico, donde dicho primer Nanocuerpo incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 147, 167 y 187 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 147, 167 o 187 y donde dicho segundo Nanocuerpo incluye al menos una CDR seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 145, 165 y 185 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 145, 165 o 185.

Preferentemente, el Nanocuerpo biparatópico comprende la estructura:

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

donde en dicho primer Nanocuerpo CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 147, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 167 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 187 y donde en dicho segundo Nanocuerpo CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 145, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 185, o donde CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.ºs 147, 167, 187, 145, 165 o 185.

Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las expuestas en las SEQ ID N.ºs 147, 167, 187, 145, 165 o 185 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las de cualquiera de las ID de secuencia anteriores solamente en uno, dos o tres aminoácidos.

De acuerdo con este aspecto de la invención, FR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 85, FR2 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 106, FR3 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 126, FR4 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 131, FR5 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 83, FR6 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 104, FR7

comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 124 y/o FR8 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 131.

Como alternativa, FRI, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 y FR8 tienen secuencias de aminoácidos con al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 85, 106, 126, 131, 83, 104 o 124.

Por ejemplo, en este aspecto de la invención, FR1 y/o FR4 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 70 a 89, FR2 y/o FR5 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 91 a 110, FR3 y/o FR6 pueden comprender la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 111 a 130 y FR4 y/o FR8 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 131 a 133.

Un Nanocuerpo biparatópico preferido de acuerdo con la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 65 o un polipéptido que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 65.

Una realización preferida del Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 65 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID N.º 65, o al menos un 80% de identidad de aminoácidos con las regiones de marco de esta de acuerdo con la numeración de Kabat, donde el Nanocuerpo biparatópico puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende sustancialmente las secuencias CDR expuestas en la SEQ ID N.º 65, pero modificadas en las regiones de marco para incluir una o más sustituciones de optimización de secuencia, preferentemente una o más de las identificadas como adecuadas en la Tabla 20 para el Nanocuerpo 2B2 y en la Tabla 28 para el Nanocuerpo 163D2. Preferentemente, el Nanocuerpo 2B2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 213 o 214 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 213 o 214 y el Nanocuerpo 163D2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 218 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 218. Por ejemplo, las regiones de marco de estos Nanocuerpos pueden tener la secuencia de las regiones de marco FR1, FR2, FR3 o FR4 de acuerdo con la numeración de Kabat que se muestran en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 213 a 219 en la Tabla 32. Preferentemente, un Nanocuerpo biparatópico con secuencia optimizada de este tipo puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

7) 97A9/2B2 (SEQ ID No 47)

Esta realización de la invención se refiere a un Nanocuerpo biparatópico donde dicho segundo Nanocuerpo incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 143, 163 y 183 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 143, 163 o 183 y donde dicho primer Nanocuerpo incluye al menos una CDR seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 147, 167 y 187 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 147, 167 o 187.

Preferentemente, el Nanocuerpo biparatópico comprende la estructura:
FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--CONECTOR--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8
donde en dicho segundo Nanocuerpo CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 143, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 163 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 183 y donde en dicho primer Nanocuerpo CDR4 comprende una secuencia de aminoácido tal como se expone en la SEQ ID N.º 147, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 167 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 187 o donde CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.ºs 143, 163, 183, 147, 167 o 187.

Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las expuestas en las SEQ ID N.ºs 143, 163, 183, 147, 167 o 187 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las de cualquiera de las ID de secuencia anteriores solamente en uno, dos o tres aminoácidos.

De acuerdo con el aspecto de la invención, FR1 comprende una secuencia de aminoácido tal como se expone en la SEQ ID N.º 81, FR2 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 102, FR3

comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 122, FR4 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 133, FR5 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 85, FR6 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 106, FR7 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 126 y/o FR8 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 131.

Como alternativa, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 y FR8 tienen secuencias de aminoácidos con al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 81, 102, 122, 133, 85, 106, 126 o 131.

Por ejemplo, en este aspecto de la invención, FR1 y/o FR4 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 70 a 89, FR2 y/o FR5 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 91 a 110, FR3 y/o FR6 pueden comprender la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 111 a 130 y FR4 y/o FR8 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 131 a 133.

Un Nanocuerpo biparatópico preferido comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 47 o un polipéptido que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 47.

En una realización particularmente preferida, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 47 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID N.º 47 o al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las regiones de marco de esta de acuerdo con la numeración de Kabat, donde el Nanocuerpo biparatópico puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende sustancialmente las secuencias CDR expuestas en la SEQ ID N.º 47, pero modificadas en las regiones de marco para incluir una o más sustituciones de optimización de secuencia, preferentemente, una o más de las identificadas como adecuadas en la Tabla 22 para el Nanocuerpo 97A9 y en la Tabla 20 para el Nanocuerpo 2B2. Preferentemente, el Nanocuerpo 97A9 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 215 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 215 y el Nanocuerpo 2B2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 213 o 214 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 213 o la SEQ ID N.º 214. Por ejemplo, las regiones de marco de estos Nanocuerpos pueden tener la secuencia de las regiones de marco FR1, FR2, FR3 o FR4 de acuerdo con la numeración de Kabat que se muestran en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 213 a 219 en la Tabla 32. Preferentemente, un Nanocuerpo biparatópico con secuencia optimizada de este tipo puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

8) 97A9/54B12 (SEQ ID No 61)

Esta realización de la invención se refiere a un Nanocuerpo biparatópico donde dicho segundo Nanocuerpo incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 143, 163 y 183 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 143, 163 o 183 y donde dicho primer Nanocuerpo incluye al menos una CDR seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 151, 171 y 191 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 151, 171 o 191.

Preferentemente, el Nanocuerpo biparatópico comprende la estructura:

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

donde en dicho segundo Nanocuerpo CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 143, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 163 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 183 y donde en dicho primer Nanocuerpo CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 151, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 171 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 191 o donde CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.ºs 143, 163, 183, 151, 171 o 191.

Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las expuestas en las SEQ ID N.ºs 143, 163, 183, 151, 171 o 191 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de cualquiera de las IDx de secuencia anteriores en solamente uno, dos o tres aminoácidos.

De acuerdo con un aspecto de la invención, FR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 81, FR2 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 102, FR3 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 122, FR4 comprende una secuencia de aminoácidos 133, FR5 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 89, FR6
5 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 110, FR7 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 130 y/o FR8 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 131.

Como alternativa, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 y FR8 tienen secuencias de aminoácidos con al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 81, 102, 122, 133, 89, 110, 130 o 131.

Por ejemplo, en este aspecto de la invención, FR1 y/o FR4 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 70 a 89, FR2 y/o FR5 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 91 a 110, FR3 y/o FR6 pueden comprender la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 111 a 130 y FR4 y/o FR8 pueden comprender la secuencia de aminoácidos
15 expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 131 a 133.

En una realización preferida, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 61 o un polipéptido que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 61.

En una realización particularmente preferida, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 61 o un aminoácido que tiene al menos un 80% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 61, o al menos un 80% de identidad con las regiones de marco de esta de acuerdo con la numeración de Kabat, donde el Nanocuerpo biparatópico puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende sustancialmente las secuencias CDR expuestas en la SEQ ID N.º 61, pero modificadas en las regiones de marco para incluir una o más sustituciones de optimización de secuencia, preferentemente una o más de las identificadas como adecuadas en la Tabla 22 para el Nanocuerpo 97A9 y en la Tabla 30 para el Nanocuerpo 54B12. Preferentemente, el Nanocuerpo 97A9 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 215 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la
25 secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 215 y el Nanocuerpo 54B12 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 219 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 219. Por ejemplo, las regiones de marco de estos Nanocuerpos pueden tener la secuencia de las regiones de marco FR1, FR2, FR3 o FR4 de acuerdo con la numeración de Kabat que se muestran en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 213 a 219 en la Tabla 32. Preferentemente, un Nanocuerpo biparatópico con secuencia optimizada de este tipo puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

9) 127D1/163D2 (SEQ ID No 53)

Esta realización de la invención se refiere a un Nanocuerpo biparatópico donde dicho primer Nanocuerpo tal como se ha definido anteriormente incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 141, 161 y 181 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 141, 161 o 181 y donde dicho segundo Nanocuerpo incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 145, 165 y 185 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 145, 165
40 o 185.

Preferentemente, el Nanocuerpo biparatópico comprende la estructura:
FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--CONECTOR--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8
donde en dicho primer Nanocuerpo CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 141, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 161 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 181 y donde en dicho segundo Nanocuerpo CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 145, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 165 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 185 o donde las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, o al menos un 85%, o al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.ºs 141, 161, 181, 145, 165 o 185.

Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 145, 165, 185, 141, 161 o 181 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de cualquiera de las ID de secuencias anteriores solamente en uno, dos o tres aminoácidos.

5 En una realización preferida de este aspecto de la invención FR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 79, FR2 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 100, FR3 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 120, FR4 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 131, FR5 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 83, FR6 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 104, FR7 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 124 y/o FR8 comprende
10 una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 131.

Como alternativa, FRI, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 y FR8 pueden tener secuencias de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 79, 100, 120, 131, 83, 104 o 124.

15 Por ejemplo, en este aspecto de la invención, FR1 y/o FR4 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 70 a 89, FR2 y/o FR5 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 91 a 110, FR3 y/o FR6 pueden comprender la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 111 a 130 y FR4 y/o FR8 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 131 a 133.

20 En una realización particularmente preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 53 o un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.^o 53.

25 En otra realización de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 53 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.^o 53 o con las regiones de marco de esta, donde el Nanocuerpo biparatópico puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una Cl_{50} inferior a 20nM.

30 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende sustancialmente las secuencias CDR expuestas en la SEQ ID N.^o 54, pero modificadas en las regiones de marco para incluir una o más sustituciones de optimización de secuencia, preferentemente una o más de las identificadas como adecuadas en la Tabla 26 para el Nanocuerpo 127D1 y en la Tabla 28 para el Nanocuerpo 163D2. Preferentemente, el Nanocuerpo 127D1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 216 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.^o 216 y el Nanocuerpo 163D2 comprende la secuencia de aminoácidos
35 expuesta en la SEQ ID N.^o 218 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.^o 218. Por ejemplo, las regiones de marco de estos Nanocuerpos pueden tener la secuencia de las regiones de marco FR1, FR2, FR3 o FR4 de acuerdo con la numeración de Kabat que se muestran en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 213 a 219 en la Tabla 32. Preferentemente, un Nanocuerpo biparatópico con secuencia optimizada de este tipo puede inhibir la unión de
40 Gro- α a CXCR2 humano con una Cl_{50} inferior a 20nM.

10) 127D1/163E3 (SEQ ID No 54)

Esta realización de la invención se refiere a un Nanocuerpo biparatópico donde dicho primer Nanocuerpo tal como se ha definido anteriormente incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.^{os} 141, 161 y 181 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos
45 un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.^{os} 141, 161 o 181 y donde dicho segundo Nanocuerpo incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.^{os} 146, 166 y 186 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.^{os} 146, 166 o 186.

50 Preferentemente, el Nanocuerpo biparatópico comprende la estructura:
FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--CONECTOR--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8
donde en dicho primer Nanocuerpo CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 141, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 161 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 181 y donde en dicho segundo Nanocuerpo CDR4 comprende
55 una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 146, CDR5 comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 166 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 186 o donde las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, o al menos un 85%, o al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.ºs 146, 166, 186, 141, 161 o 181.

Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 146, 166, 186, 141, 161 o 181 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de cualquiera de las ID de secuencias anteriores solamente en uno, dos o tres aminoácidos.

En una realización preferida de este aspecto de la invención FR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 79, FR2 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 100, FR3 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 120, FR4 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 131, FR5 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 84, FR6 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 105, FR7 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 125 y/o FR8 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 131.

Como alternativa, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 y FR8 pueden tener secuencias de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 79, 100, 120, 131, 84, 105 o 125.

Por ejemplo, en este aspecto de la invención, FR1 y/o FR4 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 70 a 89, FR2 y/o FR5 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 91 a 110, FR3 y/o FR6 pueden comprender la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 111 a 130 y FR4 y/o FR8 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 131 a 133.

En una realización particularmente preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 54 o un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 54.

En otra realización de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 54 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 54 o al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las regiones de marco de esta de acuerdo con la numeración de Kabat, donde el Nanocuerpo biparatópico puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende sustancialmente las secuencias CDR expuestas en la SEQ ID N.º 54, pero modificadas en las regiones de marco para incluir una o más sustituciones de optimización de secuencia, preferentemente una o más de las identificadas como adecuadas en la Tabla 26 para el Nanocuerpo 127D1 y en la Tabla 24 para el Nanocuerpo 163E3. Preferentemente, el Nanocuerpo 127D1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 216 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 216 y el Nanocuerpo 163E3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 217 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 217. Por ejemplo, las regiones de marco de estos Nanocuerpos pueden tener la secuencia de las regiones de marco FR1, FR2, FR3 o FR4 de acuerdo con la numeración de Kabat que se muestran en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 213 a 219 en la Tabla 32. Preferentemente, un Nanocuerpo biparatópico con secuencia optimizada de este tipo puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

11) 127D1/97A9 (SEQ ID Nos 37 y 39)

Esta realización de la invención se refiere a un Nanocuerpo biparatópico donde dicho primer Nanocuerpo tal como se ha definido anteriormente incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 141, 161 y 181 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 141, 161 o 181 y donde dicho segundo Nanocuerpo incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 143, 163 y 183 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 143, 163 o 183.

Preferentemente, el Nanocuerpo biparatópico comprende la estructura:

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

donde en dicho primer Nanocuerpo CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 141, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 161 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 181 y donde en dicho segundo Nanocuerpo CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 143, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 163 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 183 o donde las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, o al menos un 85%, o al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.ºs 141, 161, 181, 143, 163 o 183.

Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 141, 161, 181, 143, 163 o 183 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de cualquiera de las ID de secuencias anteriores solamente en uno, dos o tres aminoácidos.

En una realización preferida de este aspecto de la invención FR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 79, FR2 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 100, FR3 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 120, FR4 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 131, FR5 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 81, FR6 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 102, FR7 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 122 y/o FR8 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 133.

Como alternativa, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 y FR8 pueden tener secuencias de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 79, 100, 120, 131, 81, 102, 122 o 133.

Por ejemplo, en este aspecto de la invención, FR1 y/o FR4 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 70 a 89, FR2 y/o FR5 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 91 a 110, FR3 y/o FR6 pueden comprender la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 111 a 130 y FR4 y/o FR8 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 131 a 133.

En una realización particularmente preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende un primer dominio de unión a antígeno que comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID N.º 37 y un segundo dominio de unión a antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 39 o un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID N.ºs 37 y 39.

En otra realización de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID N.ºs 37 y 39 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las SEQ ID N.ºs 37 y 39 o con las regiones de marco de estas de acuerdo con la numeración de Kabat, donde el polipéptido biparatópico puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende sustancialmente las secuencias CDR expuestas en las SEQ ID N.ºs 37 y 39, pero modificadas en las regiones de marco para incluir una o más sustituciones de optimización de secuencia, preferentemente una o más de las identificadas como adecuadas en la Tabla 26 para el Nanocuerpo 127D1 y en la Tabla 22 para el Nanocuerpo 97A9. Preferentemente, el Nanocuerpo 127D1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 216 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 216 y el Nanocuerpo 97A9 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 215 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 215. Por ejemplo, las regiones de marco de estos Nanocuerpos pueden tener la secuencia de las regiones de marco FR1, FR2, FR3 o FR4 de acuerdo con la numeración de Kabat que se muestran en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 213 a 219 en la Tabla 32. Preferentemente, un Nanocuerpo biparatópico con secuencia optimizada de este tipo puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

12) 2B2/97A9 (SEQ ID No 46)

Esta realización de la invención se refiere a un Nanocuerpo biparatópico donde dicho primer Nanocuerpo tal como se ha definido anteriormente incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.^{os} 147, 167 y 187 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.^{os} 147, 167 o 187 y donde dicho segundo Nanocuerpo incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.^{os} 143, 163 y 183 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.^{os} 143, 163 o 183.

Preferentemente, el Nanocuerpo biparatópico comprende la estructura:

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

donde en dicho primer Nanocuerpo CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 147, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 167 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 187 y donde en dicho segundo Nanocuerpo CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 143, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 163 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 183 o donde las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, o al menos un 85%, o al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.^{os} 147, 167, 187, 143, 163 o 183.

Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 147, 167, 187, 143, 163 o 183 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de cualquiera de las ID de secuencias anteriores solamente en uno, dos o tres aminoácidos.

En una realización preferida de este aspecto de la invención FR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 85, FR2 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 106, FR3 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 126, FR4 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 131, FR5 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 81, FR6 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 102, FR7 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 122 y/o FR8 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 133.

Como alternativa, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 y FR8 pueden tener secuencias de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 85, 106, 126, 131, 81, 102, 122 o 133.

Por ejemplo, en este aspecto de la invención, FR1 y/o FR4 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 70 a 89, FR2 y/o FR5 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 91 a 110, FR3 y/o FR6 pueden comprender la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 111 a 130 y FR4 y/o FR8 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 131 a 133.

En una realización particularmente preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 46 o un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.^o 46.

En otra realización de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 46 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.^o 46 o al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a las regiones de marco de esta de acuerdo con la numeración de Kabat, donde el Nanocuerpo biparatópico puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende sustancialmente las secuencias CDR expuestas en la SEQ ID N.^o 46, pero modificadas en las regiones de marco para incluir una o más sustituciones de optimización de secuencia, preferentemente una o más de las identificadas como adecuadas en la Tabla 20 para el Nanocuerpo 2B2 y en la Tabla 22 para el Nanocuerpo 97A9. Preferentemente, el Nanocuerpo 2B2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 213 o 214 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.^o 213 o 214 y el Nanocuerpo 97A9 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 215 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.^o 215. Por ejemplo, las regiones de marco de estos Nanocuerpos pueden tener la secuencia de las regiones de marco FR1,

FR2, FR3 o FR4 de acuerdo con la numeración de Kabat que se muestran en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 213 a 219 en la Tabla 32. Preferentemente, un Nanocuerpo biparatópico con secuencia optimizada de este tipo puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una CI_{50} inferior a 20nM.

13) 54B12/163D2 (SEQ ID No 69)

- 5 Esta realización de la invención se refiere a un Nanocuerpo biparatópico donde dicho primer Nanocuerpo tal como se ha definido anteriormente incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.^{os} 151, 171 y 191 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.^{os} 151, 171 o 191 y donde dicho segundo Nanocuerpo incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.^{os} 145, 165 y 185 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.^{os} 145, 165 o 185.

Preferentemente, el Nanocuerpo biparatópico comprende la estructura:

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

- 15 donde en dicho primer Nanocuerpo CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 151, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 171 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 191 y donde en dicho segundo Nanocuerpo CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 145, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 165 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 185 o donde las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, o al menos un 85%, o al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.^{os} 151, 171, 191, 145, 165 o 185.

- 25 Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 151, 171, 191, 145, 165 o 185 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de cualquiera de las ID de secuencias anteriores solamente en uno, dos o tres aminoácidos.

- 30 En una realización preferida de este aspecto de la invención FR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 89, FR2 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 110, FR3 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 130, FR4 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 131, FR5 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 83, FR6 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 104, FR7 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 124 y/o FR8 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 131.

- 35 Como alternativa, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 y FR8 pueden tener secuencias de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 89, 110, 130, 131, 83, 104 o 124.

- 40 Por ejemplo, en este aspecto de la invención, FR1 y/o FR4 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 70 a 89, FR2 y/o FR5 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 91 a 110, FR3 y/o FR6 pueden comprender la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 111 a 130 y FR4 y/o FR8 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 131 a 133.

- 45 En una realización particularmente preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 69 o un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.^o 69.

- 50 En otra realización de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 69 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.^o 69 o al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las regiones de marco de esta de acuerdo con la numeración de Kabat, donde el Nanocuerpo biparatópico puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una CI_{50} inferior a 20nM.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende sustancialmente las secuencias CDR expuestas en la SEQ ID N.^o 69, pero modificadas en las regiones de marco para incluir una o más sustituciones de optimización de secuencia, preferentemente una o más de las identificadas como

adecuadas en la Tabla 30 para el Nanocuerpo 54B12 y en la Tabla 28 para el Nanocuerpo 163D2. Preferentemente, el Nanocuerpo 54B12 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 219 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 219 y el Nanocuerpo 163D2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 218 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 218. Por ejemplo, las regiones de marco de estos Nanocuerpos pueden tener la secuencia de las regiones de marco FR1, FR2, FR3 o FR4 de acuerdo con la numeración de Kabat que se muestran en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 213 a 219 en la Tabla 32. Preferentemente, un Nanocuerpo biparatópico con secuencia optimizada de este tipo puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

14) 54B12/163E3 (SEQ ID No 68)

Esta realización de la invención se refiere a un Nanocuerpo biparatópico donde dicho primer Nanocuerpo tal como se ha definido anteriormente incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 151, 171 y 191 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 151, 171 o 191 y donde dicho segundo Nanocuerpo incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 146, 166 y 186 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 146, 166 o 186.

Preferentemente, el Nanocuerpo biparatópico comprende la estructura:
FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--CONECTOR--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8
donde en dicho primer Nanocuerpo CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 151, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 171 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 191 y donde en dicho segundo Nanocuerpo CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 146, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 166 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 186 o donde las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, o al menos un 85%, o al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.ºs 151, 171, 191, 146, 166 o 186.

Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 151, 171, 191, 146, 166 o 186 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de cualquiera de las ID de secuencias anteriores solamente en uno, dos o tres aminoácidos.

En una realización preferida de este aspecto de la invención FR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 89, FR2 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 110, FR3 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 130, FR4 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 131, FR5 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 84, FR6 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 105, FR7 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 125 y/o FR8 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 131.

Como alternativa, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 y FR8 pueden tener secuencias de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 89, 110, 130, 131, 84, 105 o 125.

Por ejemplo, en este aspecto de la invención, FR1 y/o FR4 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 70 a 89, FR2 y/o FR5 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 91 a 110, FR3 y/o FR6 pueden comprender la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 111 a 130 y FR4 y/o FR8 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 131 a 133.

En una realización particularmente preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 68 o un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 68.

En otra realización de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 68 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad

de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 68 o al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las regiones de marco de esta de acuerdo con la numeración de Kabat, donde el Nanocuerpo biparatópico puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una CI_{50} inferior a 20nM.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende sustancialmente las secuencias CDR expuestas en la SEQ ID N.º 68, pero modificadas en las regiones de marco para incluir una o más sustituciones de optimización de secuencia, preferentemente, una o más de las identificadas como adecuadas en la Tabla 30 para el Nanocuerpo 54B12 y en la Tabla 24 para el Nanocuerpo 163E3. Preferentemente, el Nanocuerpo 54B12 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 219 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 219 y el Nanocuerpo 163E3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 217 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 217. Por ejemplo, las regiones de marco de estos Nanocuerpos pueden tener la secuencia de las regiones de marco FR1, FR2, FR3 o FR4 de acuerdo con la numeración de Kabat que se muestran en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 213 a 219 en la Tabla 32. Preferentemente, un Nanocuerpo biparatópico con secuencia optimizada de este tipo puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una CI_{50} inferior a 20nM.

15) 54B12/97A9 (SEQ ID Nos 90 y 39)

Esta realización de la invención se refiere a un Nanocuerpo biparatópico donde dicho primer Nanocuerpo tal como se ha definido anteriormente incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 141, 161 y 181 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 141, 161 o 181 y donde dicho segundo Nanocuerpo incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 143, 163 y 183 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 143, 163 o 183.

Preferentemente, el Nanocuerpo biparatópico comprende la estructura:

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

donde en dicho primer Nanocuerpo CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 141, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 161 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 181 y donde en dicho segundo Nanocuerpo CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 143, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 163 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 183 o donde las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, o al menos un 85%, o al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.ºs 141, 161, 181, 143, 163 o 183.

Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 141, 161, 181, 143, 163 o 183 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de cualquiera de las ID de secuencias anteriores solamente en uno, dos o tres aminoácidos.

En una realización preferida de este aspecto de la invención FR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 89, FR2 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 110, FR3 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 130, FR4 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 131, FR5 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 81, FR6 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 102, FR7 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 122 y/o FR8 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 131.

Como alternativa, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 y FR8 pueden tener secuencias de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 89, 110, 130, 131, 81, 102 o 122.

Por ejemplo, en este aspecto de la invención, FR1 y/o FR4 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 70 a 89, FR2 y/o FR5 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 91 a 110, FR3 y/o FR6 pueden comprender la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 111 a 130 y FR4 y/o FR8 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 131 a 133.

En una realización particularmente preferida de este aspecto de la invención el Nanocuerpo biparatópico comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.^{os} 90 y 39 o un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID N.^{os} 90 y 39.

- 5 En otra realización de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID N.^{os} 90 y 39 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las SEQ ID N.^{os} 90 y 39 o al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las regiones de marco de estas de acuerdo con la numeración de Kabat, donde el Nanocuerpo biparatópico puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.
- 10 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende sustancialmente las secuencias CDR expuestas en las SEQ ID N.^{os} 90 y 39, pero modificadas en las regiones de marco para incluir una o más sustituciones de optimización de secuencia, preferentemente una o más de las identificadas como adecuadas en la Tabla 30 para el Nanocuerpo 54B12 y en la Tabla 22 para el Nanocuerpo 97A9.
- 15 Preferentemente, el Nanocuerpo 54B12 comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.^{os} 90 y 39 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las SEQ ID N.^{os} 90 y/o 39 y el Nanocuerpo 97A9 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 215 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.^o 215. Por ejemplo, las regiones de marco de estos Nanocuerpos pueden tener la secuencia de las regiones de marco FR1, FR2, FR3 o FR4 de acuerdo con la numeración de Kabat que se muestran en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 213 a 219 en la Tabla 32. Preferentemente, un Nanocuerpo biparatópico con secuencia optimizada de este tipo puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

16) 97A9/127D1 (SEQ ID Nos 39 y 37)

- 25 Esta realización de la invención se refiere a un Nanocuerpo biparatópico donde dicho segundo Nanocuerpo tal como se define anteriormente incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.^{os} 143, 163 y 183 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.^{os} 143, 163 o 183 y donde dicho primer Nanocuerpo incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.^{os} 141, 161 y 181 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.^{os} 141, 161 o 181.

Preferentemente, el Nanocuerpo biparatópico comprende la estructura:

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

- 35 donde en dicho segundo Nanocuerpo la CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 143, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 163 y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 183 y donde en dicho primer Nanocuerpo la CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 141, la CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 161 y la CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 181 o en la que las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, o al menos un 85% o al menos un 90% o al menos un 95 % de identidad de la secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.^{os} 143, 163, 183, 141, 161 o 181.

- 45 Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 143, 163, 183, 141, 161 o 181 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de cualquiera de las ID de secuencias anteriores solamente en uno, dos o tres aminoácidos.

- En una realización preferida de este aspecto de la invención FR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 81, FR2 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 102, FR3 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 122, FR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 133, FR5 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 79, FR6 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 100, FR7 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 120 y/o FR8 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 131.

- 55 Como alternativa, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 y FR8 pueden tener secuencias de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 81, 102, 122, 133, 79, 100, 120 o 131.

Por ejemplo, en este aspecto de la invención, FR1 y/o FR4 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 70 a 89, FR2 y/o FR5 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 91 a 110, FR3 y/o FR6 pueden comprender la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 111 a 130 y FR4 y/o FR8 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 131 a 133.

En una realización particularmente preferida de este aspecto de la invención el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID N.^{os} 39 y 37 o un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID N.^{os} 39 y/o 37.

En otra realización de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID N.^{os} 39 y 37 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las SEQ ID N.^{os} 39 y/o 37 o al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las regiones de marco de esta de acuerdo con la numeración de Kabat, donde el Nanocuerpo biparatópico puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende sustancialmente las secuencias CDR expuestas en las SEQ ID N.^{os} 39 y 37, pero modificadas en las regiones de marco para incluir una o más sustituciones de optimización de secuencia, preferentemente una o más de las identificadas como adecuadas en la Tabla 22 para el Nanocuerpo 97A9 y en la Tabla 26 para el Nanocuerpo 97A9. Preferentemente, el Nanocuerpo 97A9 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID N.^{os} 39 y 37 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las SEQ ID N.^{os} 39 y 37 y el Nanocuerpo 127D1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 216 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.^o 216. Por ejemplo, las regiones de marco de estos Nanocuerpos pueden tener la secuencia de las regiones de marco FR1, FR2, FR3 o FR4 de acuerdo con la numeración de Kabat que se muestran en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 213 a 219 en la Tabla 32. Preferentemente, un Nanocuerpo biparatópico con secuencia optimizada de este tipo puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

17) 163D2/2B2 (SEQ ID No 67)

Esta realización de la invención se refiere a un Nanocuerpo biparatópico donde dicho segundo Nanocuerpo tal como se define anteriormente incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.^{os} 145, 165 y 185 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.^{os} 145, 165 o 185 y donde dicho primer Nanocuerpo incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.^{os} 147, 167 y 187 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.^{os} 147, 167 o 187.

Preferentemente, el Nanocuerpo biparatópico comprende la estructura:
FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--CONECTOR--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8
donde en dicho segundo Nanocuerpo la CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 145, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 165 y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 185 y donde en dicho primer Nanocuerpo la CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 147, la CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 167 y la CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 187 o en la que las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, o al menos un 85% o al menos un 90% o al menos un 95 % de identidad de la secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.^{os} 145, 165, 185, 147, 167 o 187.

Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.^{os} 145, 165, 185, 147, 167 o 187 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de cualquiera de las ID de secuencias anteriores solamente en uno, dos o tres aminoácidos.

En una realización preferida de este aspecto de la invención FR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 83, FR2 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 104, FR3 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 124, FR4 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.^o 131, FR5 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 85, FR6 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 106, FR7 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 126 y/o FR8 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.^o 131.

Como alternativa, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 y FR8 pueden tener secuencias de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 83, 104, 124, 131, 85, 106 o 126.

- 5 Por ejemplo, en este aspecto de la invención, FR1 y/o FR4 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 70 a 89, FR2 y/o FR5 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 91 a 110, FR3 y/o FR6 pueden comprender la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 111 a 130 y FR4 y/o FR8 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 131 a 133.
- 10 En una realización particularmente preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 67 o un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 67.
- 15 En otra realización de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 67 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 67, al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las regiones de marco de esta de acuerdo con la numeración de Kabat, donde el Nanocuerpo biparatópico puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una CI_{50} inferior a 20nM.
- 20 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende sustancialmente las secuencias CDR expuestas en la SEQ ID N.º 67, pero modificadas en las regiones de marco para incluir una o más sustituciones de optimización de secuencia, preferentemente una o más de las identificadas como adecuadas en la Tabla 28 para el Nanocuerpo 163D2 y en la Tabla 20 para el Nanocuerpo 2B2. Preferentemente, el Nanocuerpo 163D2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 218 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la
- 25 secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 218 y el Nanocuerpo 2B2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID N.ºs 213 o 214 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con cualquiera de las SEQ ID N.ºs 213 o 214. Por ejemplo, las regiones de marco de estos Nanocuerpos pueden tener la secuencia de las regiones de marco FR1, FR2, FR3 o FR4 de acuerdo con la numeración de Kabat que se muestran en cualquiera de las SEQ
- 30 ID N.ºs 213 a 219 en la Tabla 32. Preferentemente, un Nanocuerpo biparatópico con secuencia optimizada de este tipo puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una CI_{50} inferior a 20nM.

18) 163E3/2B2 (SEQ ID No 66)

- Esta realización de la invención se refiere a un Nanocuerpo biparatópico donde dicho segundo Nanocuerpo tal como se define anteriormente incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 146, 166 y 186 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 146, 166 o 186 y donde dicho primer Nanocuerpo incluye al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las SEQ ID N.ºs 147, 167 y 187 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.ºs 147, 167 o 187.

- Preferentemente, el Nanocuerpo biparatópico comprende la estructura:
FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--CONECTOR--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8
donde en dicho segundo Nanocuerpo la CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 146, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 166 y la CDR3
- 45 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 186 y donde en dicho primer Nanocuerpo la CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 147, la CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 167 y la CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 187 o en la que las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, o al menos un 85% o al menos un 90% o al menos un
- 50 95 % de identidad de la secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.ºs 146, 166, 186, 147, 167 o 187.

Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de las expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 146, 166, 186, 147, 167 o 187 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias de aminoácidos pueden diferir de cualquiera de las ID de secuencias anteriores solamente en uno, dos o tres aminoácidos.

- 55 En una realización preferida de este aspecto de la invención FR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como

se expone en la SEQ ID N.º 84, FR2 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 105, FR3 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 125, FR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 131, FR5 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 85, FR6 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 106, FR7 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 126 y/o FR8 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 131.

Como alternativa, FR1, FR2, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7 y FR8 pueden tener secuencias de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos expuestas en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 84, 105, 125, 131, 85, 106 o 126.

Por ejemplo, en este aspecto de la invención, FR1 y/o FR4 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 70 a 89, FR2 y/o FR5 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 91 a 110, FR3 y/o FR6 pueden comprender la secuencia de aminoácidos tal como se expone en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 111 a 130 y FR4 y/o FR8 pueden comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 131 a 133.

En una realización particularmente preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 66 o un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad de aminoácidos, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 66.

En otra realización de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 66 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 66 o al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con las regiones de marco de esta de acuerdo con la numeración de Kabat, donde el Nanocuerpo biparatópico puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el Nanocuerpo biparatópico de la invención comprende sustancialmente las secuencias CDR expuestas en la SEQ ID N.º 66, pero modificadas en las regiones de marco para incluir una o más sustituciones de optimización de secuencia, preferentemente una o más de las identificadas como adecuadas en la Tabla 24 para el Nanocuerpo 163E3 y en la Tabla 20 para el Nanocuerpo 2B2. Preferentemente, el Nanocuerpo 163E3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 217 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 217 y el Nanocuerpo 2B2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID N.ºs 213 o 214 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con cualquiera de las SEQ ID N.ºs 213 o 214. Por ejemplo, las regiones de marco de estos Nanocuerpos pueden tener la secuencia de las regiones de marco FR1, FR2, FR3 o FR4 de acuerdo con la numeración de Kabat que se muestran en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 213 a 219 en la Tabla 32. Preferentemente, un Nanocuerpo biparatópico con secuencia optimizada de este tipo puede inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una IC_{50} inferior a 20nM.

Tal como ya se ha discutido en la presente, es deseable si los Nanocuerpos biparatópicos preferidos de la invención que incluyen las realizaciones específicas y variantes de estas designadas 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 tienen dentro de sus regiones de marco al menos una sustitución de aminoácidos de optimización de secuencias y dichas regiones de marco pueden estar parcial o totalmente humanizadas, por ejemplo. Es deseable si el grado de optimización de secuencia da como resultado un Nanocuerpo biparatópico que tiene de un 80 a un 90% de identidad de secuencia al menos respecto a las regiones de marco, con las SEQ ID N.ºs 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47, 61, 53, 54, 46, 69, 68, 67 o 66.

Algunas realizaciones de la invención comprenden además polipéptidos en los que el primer dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de las SEQ ID N.º 213, 214, 216 y 219 o un polipéptido que tiene al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad respecto a una de estas y el segundo dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de las SEQ ID N.º 215, 217 y 218 o un polipéptido que tiene al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad respecto a una de estas.

(0079-0076)

En una realización de la invención, el polipéptido comprende en dicha segunda inmunoglobulina de un dominio variable único la CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 141, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 236 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos

expuesta en la SEQ ID N.º 181 y comprende además en dicha primera inmunoglobulina de un dominio variable único la CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 146, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 237 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 186. En realizaciones adicionales, las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.ºs 141, 236, 181, 146, 237 o 186.

En una realización adicional, el polipéptido comprende secuencias de aminoácidos que difieren de las expuestas en las SEQ ID N.ºs 141, 236, 181, 146, 237 o 186 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas.

En una realización adicional, el polipéptido comprende un primer dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID N.º 216 o un polipéptido que tiene al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad respecto a la SEQ ID N.º 216 y el segundo dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID N.º 217 o un polipéptido que tiene al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad respecto a la SEQ ID N.º 217.

En otra realización adicional, el polipéptido comprende la SEQ ID N.º 221.

(0079-0086)

En una realización de la invención, el polipéptido comprende en dicha segunda inmunoglobulina de un dominio variable único la CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 141, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 236 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 181 y comprende además en dicha primera inmunoglobulina de un dominio variable único la CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 145, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 165 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 185. En realizaciones adicionales, las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.ºs 141, 236, 181, 145, 165 o 185.

En una realización adicional, el polipéptido comprende secuencias de aminoácidos que difieren de las expuestas en las SEQ ID N.ºs 141, 236, 181, 145, 165 o 185 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas.

En una realización adicional, el polipéptido comprende un primer dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID N.º 216 o un polipéptido que tiene al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad respecto a la SEQ ID N.º 216 y el segundo dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID N.º 218 o un polipéptido que tiene al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad respecto a la SEQ ID N.º 218.

En otra realización adicional, el polipéptido comprende la SEQ ID N.º 222.

(0079-0061)

En una realización de la invención, el polipéptido comprende en dicha segunda inmunoglobulina de un dominio variable único la CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 141, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 236 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 181 y comprende además en dicha primera inmunoglobulina de un dominio variable único la CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 143, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 235 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 183. En realizaciones adicionales, las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.ºs 141, 236, 181, 143, 235 o 183.

En una realización adicional, el polipéptido comprende secuencias de aminoácidos que difieren de las expuestas en las SEQ ID N.ºs 141, 236, 181, 143, 235 o 183 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas.

En una realización adicional, el polipéptido comprende un primer dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID N.º 216 o un polipéptido que tiene al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad respecto a la SEQ ID N.º 216, y el segundo dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID N.º 215 o un polipéptido que tiene al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad respecto a la SEQ ID N.º 215, separados por un conector con la SEQ ID N.º 220.

(0104-0076)

En una realización de la invención, el polipéptido comprende en dicha segunda inmunoglobulina de un dominio variable único la CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 151, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 171 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 191 y comprende además en dicha primera inmunoglobulina de un dominio variable único la CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 146, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 237 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 186. En realizaciones adicionales, las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.ºs 151, 171, 191, 146, 237 o 186.

En una realización adicional, el polipéptido comprende secuencias de aminoácidos que difieren de las expuestas en las SEQ ID N.ºs 151, 171, 191, 146, 237 o 186 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas.

En una realización adicional, el polipéptido comprende un primer dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID N.º 219 o un polipéptido que tiene al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad respecto a la SEQ ID N.º 219, y el segundo dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID N.º 217 o un polipéptido que tiene al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad respecto a la SEQ ID N.º 217.

En otra realización adicional, el polipéptido comprende la SEQ ID N.º 223.

(0104-0086)

En una realización de la invención, el polipéptido comprende en dicha segunda inmunoglobulina de un dominio variable único la CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 151, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 171 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 191 y comprende además en dicha primera inmunoglobulina de un dominio variable único la CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 145, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 165 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 185. En realizaciones adicionales, las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.ºs 151, 171, 191, 145, 165 o 185.

En una realización adicional, el polipéptido comprende secuencias de aminoácidos que difieren de las expuestas en las SEQ ID N.ºs 151, 171, 191, 145, 165 o 185 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas.

En una realización adicional, el polipéptido comprende un primer dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID N.º 219 o un polipéptido que tiene al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad respecto a la SEQ ID N.º 219, y el segundo dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID N.º 218 o un polipéptido que tiene al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad respecto a la SEQ ID N.º 218.

En otra realización adicional, el polipéptido comprende la SEQ ID N.º 224.

(0104-0061)

En una realización de la invención, el polipéptido comprende en dicha segunda inmunoglobulina de un dominio variable único la CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 151, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 171 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 191 y comprende además en dicha primera inmunoglobulina de un dominio variable único la CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 143, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 235 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 183. En realizaciones adicionales, las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 o CDR6 tienen al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID N.ºs 151, 171, 191, 143, 235 o 183.

En una realización adicional, el polipéptido comprende secuencias de aminoácidos que difieren de las expuestas en las SEQ ID N.ºs 151, 171, 191, 143, 235 o 183 solamente en modificaciones de aminoácidos conservativas.

En una realización adicional, el polipéptido comprende un primer dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID N.º 219 o un polipéptido que tiene al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad respecto a la SEQ ID N.º 219, y el segundo dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID N.º 215 o un polipéptido que tiene al menos un 80%, tal como al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 95% de identidad respecto a la SEQ ID N.º 215, separados por un conector con la SEQ ID N.º 220.

En relación con la discusión anterior de las realizaciones preferidas de acuerdo con la invención, se sobreentenderá que aunque se refiere específicamente a Nanocuerpos biparatópicos, la divulgación también se refiere a polipéptidos biparatópicos dirigidos contra CXCR2 o que se unen a él, donde el primer y segundo dominios de unión están comprendidos en anticuerpos tetracatenarios convencionales, anticuerpos de cadena pesada, Fv monocatenarios, Fab o Fab(2), pero que tienen una o más de las características funcionales o estructurales de las realizaciones preferidas anteriores.

También se divulgan expresamente realizaciones en las que el primer y segundo dominios de unión a antígeno están comprendidos dentro de dominios variables únicos de inmunoglobulina tales como dominios V_L, dominios V_H, (dAb) y dominios V_{HH} y fragmentos de estos que tienen una o más características funcionales o estructurales de cada una de las realizaciones anteriores.

En otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos y, en particular, dominios variables únicos de inmunoglobulina tales como un dominio V_{HH} o Nanocuerpo que son monovalentes con respecto a la unión a CXCR2 y que son componentes para los polipéptidos biparatópicos de la invención y se pueden considerar intermedios en el proceso de producción de estos. Los dominios variables únicos de inmunoglobulina monovalentes preferidos son aquellos polipéptidos con las SEQ ID N.ºs 25 a 43 y 90 mostrados en la Tabla 9 o los polipéptidos con al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a cualquiera de las SEQ ID N.ºs 25 a 43 y 90.

Un polipéptido monovalente preferido es aquel designado 137B7 y que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 36 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID N.º 36. En una realización preferida, las regiones de marco de la SEQ ID N.º 36 tienen una o más sustituciones de aminoácidos de optimización de secuencia. Otros polipéptidos monovalentes preferidos son aquellos designados 127D1, 2B2, 54B12, 97A9, 163D2 y 163E3, incluidos aquellos a los que se ha optimizado la secuencia en las regiones de marco.

Por ejemplo, 127D1 puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 37 en la que se han llevado a cabo una o más sustituciones de aminoácidos de optimización de secuencia tal como se contemplan en la Tabla 26 y, preferentemente, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 216.

2B2 puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 43 en la que se han llevado a cabo una o más sustituciones de optimización de secuencia tal como se contemplan en la Tabla 20 y, preferentemente, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID N.º 213 o 214.

54B12 puede comprender la SEQ ID N.º 90 en la que se han llevado a cabo una o más sustituciones de optimización de secuencia tal como se contemplan en la Tabla 30 y, preferentemente, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 219.

97A9 puede comprender la SEQ ID N.º 39 en la que se han llevado a cabo una o más sustituciones de optimización de secuencia tal como se contemplan en la Tabla 22 y, preferentemente, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 215.

163D2 puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 41 en la que se han llevado a cabo una o más sustituciones de optimización de secuencia tal como se contemplan en la Tabla 28 y, preferentemente, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 218.

163E3 puede comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 42 en la que se han llevado a cabo una o más sustituciones de optimización de secuencia tal como se contemplan en la Tabla 24 y, preferentemente, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 217.

También se engloban en este aspecto de la invención polipéptidos monovalentes, en particular, dominios variables únicos de inmunoglobulina tales como Nanocuerpos que son capaces de bloquear de forma cruzada la unión a CXCR2 con un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.ºs 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47 o 61.

Cualquiera de los Nanocuerpos monovalentes preferidos discutidos anteriormente y, en particular, 137B7, se pueden utilizar para las aplicaciones enumeradas en la presente, por ejemplo, en el tratamiento de la EPOC.

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

5 Preferentemente, las secuencias CDR y secuencias FR en los polipéptidos biparatópicos, en particular, los dominios variables únicos de inmunoglobulina biparatópicos de la invención son tales que:

- se unen a CXCR2 con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o inferior, y preferentemente de 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o inferior, y más preferentemente, de 10^{-8} a 10^{-12} moles/litro (es decir, con una constante de asociación (K_A) de 10^5 a 10^{12} litro/ moles o superior y, preferentemente, de 10^7 a 10^{12} litro/moles o superior y, más preferentemente, de 10^8 a 10^{12} litro/moles);

10 y/o tales que:

- se unen a CXCR2 con una velocidad k_a de entre $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, preferentemente entre $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, más preferentemente entre $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, tal como entre $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$;

y/o tales que:

- 15 - se unen a CXCR2 con una velocidad k_d de entre 1 s^{-1} ($t_{1/2}=0.69 \text{ s}$) y 10^{-6} s^{-1} (que proporciona un complejo prácticamente irreversible con un $t_{1/2}$ de varios días), preferentemente entre 10^{-2} s^{-1} y 10^{-6} s^{-1} , más preferentemente entre 10^{-3} s^{-1} y 10^{-6} s^{-1} , tal como entre 10^{-4} s^{-1} y 10^{-6} s^{-1} .

Preferentemente, las secuencias CDR y las secuencias FR presentes en los polipéptidos y dominios variables únicos de inmunoglobulina biparatópicos de la invención son tales que se unen a CXCR2 con una afinidad inferior a 500 nM, preferentemente inferior a 200 nM, más preferentemente inferior a 10 nM, tal como inferior a 500 pM.

20 En particular, tal como se muestra en los Ejemplos en la presente, los Nanocuerpos biparatópicos preferidos de la invención son capaces de inhibir la unión de Gro- α a CXCR2 humano con una CI_{50} inferior a 20nM. Los Nanocuerpos biparatópicos preferidos de acuerdo con la invención también pueden inhibir la liberación de Ca inducida por agonistas (Gro- α) a partir de células RBL que portan CXCR2 con una CI_{50} inferior a 100 nM. Los Nanocuerpos biparatópicos preferidos de acuerdo con la invención también pueden inhibir la acumulación de [^{35}S]GTP γ S inducida por agonistas (Gro- α) en las membranas de CXCR2-CHO con una CI_{50} inferior a 50 nM. Los Nanocuerpos biparatópicos preferidos de la invención también pueden inhibir el cambio morfológico de los leucocitos humanos cuando son expuestos a Gro- α con una CI_{50} inferior a < 1nm o el cambio morfológico de los leucocitos de cinomolgo con una CI_{50} inferior a < 2nm.

30 De acuerdo con un aspecto más preferido de la invención, un polipéptido biparatópico de la invención tal como un dominio variable único de inmunoglobulina biparatópico, p. ej., un Nanocuerpo tal como se describe en la presente bloqueará de forma cruzada la unión a un polipéptido de CXCR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 1 con cualquiera de los polipéptidos expuestos en las SEQ ID N.ºs 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47 o 61. El bloqueo de forma cruzada se puede medir mediante cualquiera de los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

35 Para el uso farmacéutico, los polipéptidos de la invención se dirigen preferentemente contra CXCR2 humano, por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 1, mientras que para fines veterinarios, los polipéptidos de la invención se dirigen preferentemente contra CXCR2 de las especies a tratar, o al menos reaccionan de forma cruzada con el CXCR2 de las especies a tratar.

Además, un polipéptido biparatópico de la invención puede, opcionalmente, y además de los al menos dos dominios de unión a antígeno para la unión frente a CXCR2, contener uno o más sitios o dominios de unión adicionales para unirse frente a otros epítopos, antígenos, proteínas o dianas.

40 La eficacia de los polipéptidos de la invención y de las composiciones que los comprenden se puede evaluar utilizando cualquier ensayo *in vitro*, ensayo basado en células, ensayo *in vivo* y/o modelo animal conocido de por sí, o cualquier combinación de estos, adecuado para indicar que el polipéptido puede ser útil para tratar la EPOC o cualquier otra enfermedad que conlleva una transducción de señales de CXCR2 aberrante. Los ensayos y los modelos animales adecuados serán evidentes para el experto.

45 Además, de acuerdo con la invención, los polipéptidos que se dirigen contra CXCR2 humano pueden mostrar o no reactividad cruzada con CXCR2 de una o más especies diferentes de animal de sangre caliente. Sin embargo, preferentemente, los polipéptidos de la invención dirigidos contra CXCR2 humano mostrarán reactividad cruzada con CXCR2 de una o más especies diferentes de primates (tales como, sin carácter limitante, monos del género *Macaca* (tal como, y en particular, macacos cinomolgos (*Macaca fascicularis*) y/o macacos Rhesus (*Macaca mulatta*)) y babuino (*Papio ursinus*)) a efectos de evaluación de la toxicidad. La reactividad cruzada preferida es con CXCR2 de macacos cinomolgos. La reactividad cruzada con una o más especies de animales que a menudo se utilizan en

modelos animales para enfermedades (por ejemplo, ratón, rata, conejo, cerdo o perro) y, en particular, en modelos animales para enfermedades y trastornos asociados con CXCR2 pueden ser deseables. A este respecto, será evidente para el experto que dicha reactividad cruzada, cuando está presente, puede tener ventajas desde el punto de vista del desarrollo de fármacos, ya que permite que las secuencias de aminoácidos y polipéptidos contra CXCR2 humano se evalúen en dichos modelos de enfermedad.

De forma más general, los polipéptidos de la invención que reaccionan de forma cruzada con CXCR2 de múltiples especies de mamífero habitualmente serán ventajosos para su uso en aplicaciones veterinarias, ya que permitirán que el mismo polipéptido se utilice en múltiples especies.

Preferentemente, los polipéptidos biparatópicos de la invención no reaccionan de forma cruzada con CXCR1 o CXCR4.

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

El polipéptido biparatópico, por ejemplo, dominio variable único de inmunoglobulina de la invención puede ser tal que el segundo dominio de unión a antígeno no se una al péptido lineal de SEQ ID N.º 7 reconozca un epítipo que comprende los péptidos expuestos en la presente como las SEQ ID N.ºs 8, 9, 10, 11 o 12 o se encuentre dentro de ellos. Además, el primer dominio de unión a antígeno puede reconocer un epítipo que comprende el péptido de SEQ ID N.º 7 o se encuentra dentro de él.

En las realizaciones de la invención que reaccionan de forma cruzada con CXCR2 de macaco cinomolgo, el primer dominio de unión a antígeno también reconoce un epítipo que comprende el péptido de SEQ ID N.º 4 o se encuentra dentro de él. El segundo dominio de unión a antígeno en una realización de este tipo puede reconocer un epítipo que comprende los péptidos de SEQ ID N.º 5 o 6, o se encuentra dentro de ellos.

También se proporcionan dentro del alcance de la invención tipos de polipéptidos biparatópicos, en particular, Nanocuerpos biparatópicos que se unirán generalmente a todos los análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos de CXCR2 de origen natural o sintéticos, o al menos a aquellos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos de CXCR2 que contengan uno o más epítopos o determinantes antigénicos que sean esencialmente iguales al o a los epítopos o determinantes antigénicos a los que se unen los polipéptidos de la invención en CXCR2 (p. ej., en el CXCR2 de origen natural de SEQ ID N.º 1). En tal caso, los polipéptidos de la invención se pueden unir a dichos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos con una afinidad y/o especificidad que sean iguales a las afinidades y especificaciones discutidas anteriormente con las que los polipéptidos de la invención se unen a CXCR2 (de origen natural) o que sean diferentes de estas (es decir, superiores o inferiores).

Además, como resultará claro para el experto, los polipéptidos que son biparatópicos se unen a CXCR2 con una avidéz superior a un polipéptido de dominio de unión a antígeno único correspondiente.

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

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido biparatópico, opcionalmente, dominios variables únicos de inmunoglobulina biparatópicos que opcionalmente comprenden además uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión diferentes. Dichos grupos, residuos, restos, unidades de unión o secuencias de aminoácidos adicionales pueden proporcionar o no funcionalidad adicional al polipéptido de la invención y pueden modificar o no las propiedades de este.

Por ejemplo, dichos grupos, residuos, restos o unidades de unión adicionales pueden ser una o más secuencias de aminoácidos adicionales, de modo que la invención sea una proteína (de fusión) o un polipéptido (de fusión). En un aspecto preferido, pero no limitante, dichos uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión diferentes son secuencias de inmunoglobulina. De forma incluso más preferente, dichos uno o más grupos, residuos, restos o unidades de unión diferentes se seleccionan a partir del grupo compuesto por anticuerpos de dominio, secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como un anticuerpo de dominio, anticuerpos de dominio único, secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como un anticuerpo de dominio único, «dAb», secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como un dAb o Nanocuerpos.

Como alternativa, dichos grupos, residuos, restos o unidades de unión pueden ser, por ejemplo, grupos químicos, residuos, restos, que pueden o no ser por sí mismos biológica y/o farmacológicamente activos. Por ejemplo, dichos

grupos se pueden conectar al o a los polipéptidos de la invención para proporcionar un «derivado» de un polipéptido de la invención, tal como se describe adicionalmente en la presente.

En dichos constructos, el o los polipéptidos de la invención y el o los grupos, residuos, restos o unidades de unión se pueden conectar directamente entre sí y/o mediante uno o más conectores o espaciadores adecuados. Por ejemplo, cuando el o los grupos, residuos, restos o unidades de unión son secuencias de aminoácidos, los conectores también pueden ser secuencias de aminoácidos, de modo que el constructo resultante sea una (proteína) de fusión o un (polipéptido) de fusión.

Como será evidente 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 «componente» para formar polipéptidos adicionales de la invención, es decir, combinándolos de forma adecuada con otros grupos, residuos, restos o unidades de unión con el fin de formar constructos tal como se describen en la presente que sean multiparatópicos y opcionalmente multivalentes o multispecíficos, bi/multivalentes y bi/multispecíficos.

Los polipéptidos de este aspecto de la invención se pueden preparar generalmente mediante un método que comprende al menos un paso de conectar de forma adecuada el o los polipéptidos de la invención con el o los grupos, residuos, restos o unidades de unión adicionales, opcionalmente mediante el o los conectores adecuados.

En un aspecto específico de la invención, el polipéptido biparatópico de la invención se modifica para que tenga una semivida aumentada, en comparación con el correspondiente polipéptido no modificado de la invención. Algunos polipéptidos preferidos resultarán evidentes para el experto basándose en la divulgación adicional en la presente y, por ejemplo, comprenden secuencias de aminoácidos o polipéptidos de la invención que se han modificado químicamente para aumentar su semivida (por ejemplo, por medio de pegilación, pasilación o hesilación); los polipéptidos de la invención pueden comprender al menos un sitio de unión adicional para unirse a una seroproteína (tal como seroalbúmina); o los polipéptidos de la invención pueden comprender al menos una secuencia de aminoácidos que se conecta con al menos un resto (y, en particular, al menos una secuencia de aminoácidos) que aumenta la semivida del polipéptido de la invención. Algunos ejemplos de polipéptidos de la invención que comprenden dichos restos o secuencias de aminoácidos que extienden la semivida incluyen polipéptidos que se conectan de forma adecuada a una o más seroproteínas o fragmentos de estas (tales como seroalbúmina (humana) o fragmentos adecuados de esta) o a una o más unidades de unión que se pueden unir a seroproteínas (tales como, por ejemplo, dominios de anticuerpo, secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como un anticuerpo de dominio, anticuerpos de dominio único, secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como un anticuerpo de dominio único, «dAb», secuencias de aminoácidos que son adecuadas para su uso como un dAb, o Nanocuerpos que se pueden unir a seroproteínas tales como seroalbúmina (tales como seroalbúmina humana), inmunoglobulinas séricas tales como IgG, o transferrina; polipéptidos que se conectan con una porción Fc (tal como un Fc humano) o una parte o fragmento adecuados de estos. Los polipéptidos de la invención que están conectados a una o más proteínas o péptidos de bajo peso molecular que se pueden unir a seroproteínas (tales como, sin carácter limitante, las proteínas y péptidos descritos en los documentos WO 91/01743, WO 01/45746, WO 02/076489 y la solicitud provisional de EE. UU. de Ablynx N.V. titulada "*Peptides capable of binding to serum proteins*" de Ablynx N.V. presentada el 5 de diciembre de 2006 (remítase también al documento WO2008/068280 también se incorporan dentro de la invención.

Una de las técnicas más ampliamente utilizadas para aumentar la semivida y/o reducir la inmunogenicidad de las proteínas farmacéuticas comprende la unión de un polímero farmacológicamente aceptable adecuado tal como poli(etilenglicol) (PEG) o derivados de este (tales como metoxipoli(etilenglicol) o mPEG).

Por lo general, se puede utilizar cualquier forma adecuada de pegilación, tal como la pegilación utilizada en la técnica para anticuerpos y fragmentos de anticuerpo (que incluyen, sin carácter limitante, anticuerpos de dominio (único) y de ScFv); se hace referencia a, por ejemplo, Chapman, *Nat. Biotechnol.*, 54, 531-545 (2002); de Veronese y Harris, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 453-456 (2003), de Harris y Chess, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2, (2003) y en el documento WO 04/060965. Varios reactivos de pegilación de proteínas también se pueden adquirir de distribuidores comerciales, por ejemplo, de Nektar Therapeutics, EE. UU.

Preferentemente, se utiliza la pegilación dirigida al sitio, en particular, a través de un residuo de cisteína (remítase, por ejemplo, a Yang *et al.*, *Protein Engineering*, 16, 10, 761-770 (2003). Por ejemplo, para este fin, se puede unir PEG a un residuo de cisteína que se encuentre de forma natural en un Nanocuerpo biparatópico de la invención. Un polipéptido biparatópico de la invención se puede modificar para introducir de forma adecuada uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG, o una secuencia de aminoácidos que comprende uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG se puede fusionar al extremo N y/o C terminal de un polipéptido biparatópico, donde todas utilizan técnicas de modificación de proteínas de por sí conocidas por el experto.

Preferentemente, para los dominios variables únicos de inmunoglobulina y polipéptidos biparatópicos de la invención, se utiliza un PEG con un peso molecular superior a 5000, tal como superior a 10 000 e inferior a 200 000, tal como inferior a 100 000, por ejemplo, en el intervalo de 20 000-80 000.

La pegilación se puede aplicar a uno o ambos de los dominios variables de inmunoglobulina y/o a cualquier región conectora peptídica. Algunas técnicas de pegilación adecuadas se describen en el documento EP 1639011.

Como alternativa al PEG, la semivida se puede extender con una técnica conocida como HESilación, que conlleva la unión de derivados de hidroxietilalmidón (HES) a los polipéptidos de la invención. El hidroxietilalmidón utilizado es una amilopectina procedente de almidón de maíz ceroso que se ha modificado por medio de hidrólisis ácida para ajustar el peso molecular y en el cual los residuos de glucosa se han hidroxietilado. Se pueden obtener detalles adicionales de Pavisic R, *et al.*, *Int J Pharm* (2010) 15 de marzo, 387 (1-2):110-9.

Por lo general, los polipéptidos de la invención con semivida aumentada tienen preferentemente una semivida que es al menos 1.5 veces, preferentemente al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo, al menos 10 veces o más de 20 veces, superior a la semivida del polipéptido de la invención correspondiente por sí mismo. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención con semivida aumentada pueden tener una semivida que se aumente con más de 1 hora, preferentemente más de 2 horas, más preferentemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 o 72 horas, en comparación con el polipéptido de la invención correspondiente por sí mismo.

En un aspecto preferido de la invención, dichos polipéptidos de la invención tienen una semivida en suero que se aumenta con más de 1 hora, más de 2 horas, más preferentemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 o 72 horas, en comparación con los polipéptidos de la invención correspondientes por sí mismos.

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

La invención se refiere además a métodos para preparar o generar polipéptidos, ácidos nucleicos, células hospedadoras y composiciones de la invención tal como se describen en la presente.

Por lo general, estos métodos pueden comprender los pasos de:

- a) proporcionar un conjunto, selección o colección de polipéptidos; y
- b) cribar dicho conjunto, selección o colección de polipéptidos para encontrar secuencias de aminoácidos que se puedan unir a CXCR2 y/o tener afinidad por él; y
- c) aislar la o las secuencias de aminoácidos que se puedan unir a CXCR2 y/o tengan afinidad por él.

El conjunto, selección o colección de polipéptidos puede ser un conjunto, selección o colección de secuencias de inmunoglobulinas (tal como se describe en la presente), tal como un conjunto, selección o colección de secuencias de inmunoglobulinas inmaduras; un conjunto, selección o colección de secuencias de inmunoglobulinas sintéticas o semisintéticas; y/o un conjunto, selección o colección de secuencias de inmunoglobulinas que se han sometido a maduración de afinidad.

Además, en un método de este tipo, el conjunto, selección o colección de polipéptidos puede ser un conjunto, selección o colección 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, selección o colección de polipéptidos puede ser un conjunto, selección o colección de anticuerpos de dominio o anticuerpos de dominio único, o puede ser un conjunto, selección o colección de secuencias de aminoácidos que son capaces de funcionar como un anticuerpo de dominio o un anticuerpo de dominio único.

En un aspecto preferido de este método, el conjunto, selección o colección de polipéptidos puede ser un conjunto, selección o colección de secuencias de inmunoglobulinas inmunitarias, por ejemplo, procedentes de un mamífero, por ejemplo, una llama que se ha inmunizado de forma adecuada con CXCR2 o con un determinante antigénico adecuado basado en él o procedente de él tal como una parte, fragmento, dominio, bucle u otro epítipo antigénico de este.

En los métodos anteriores, el conjunto, selección o colección de péptidos o polipéptidos se puede presentar en un fago, fagémido, ribosoma o microorganismo adecuado (tal como levadura), de modo que se facilite el cribado. Los métodos, técnicas y organismos hospedadores adecuados para presentar y cribar (un conjunto, selección o colección de) secuencias de aminoácidos serán evidentes para el experto en la técnica, por ejemplo, basándose en la divulgación adicional en la presente. También se hace referencia a la revisión de Hoogenboom en *Nature Biotechnology*, 23, 9, 1105-1116 (2005).

En otro aspecto, el método para generar polipéptidos para su uso en la construcción de un polipéptido biparatópico de acuerdo con la invención comprende al menos los pasos de:

- 5 a) proporcionar una selección o muestra de células que expresan polipéptidos;
- b) cribar dicha selección o muestra de células para encontrar células que expresen un polipéptido que se pueda unir a CXCR2 y/o tener afinidad por él; y
- c) o bien (i) aislar dicho polipéptido; o bien (ii) aislar de dicha célula una secuencia de ácido nucleico que codifique dicho polipéptido y después expresar dicho polipéptido.

10 Por ejemplo, cuando el polipéptido deseado es una secuencia de inmunoglobulina, la selección o muestra de células puede ser, por ejemplo, una selección o muestra de linfocitos B. Además, en este método, la muestra de células puede proceder de un mamífero, por ejemplo, una llama que haya sido inmunizada adecuadamente con CXCR2 o con un determinante antigénico adecuado basado en él o procedente de él tal como una parte, fragmento, región, dominio, bucle u otro epítipo antigénico de este. En un aspecto particular, dicho determinante antigénico puede ser una parte, región, dominio, bucle extracelular u otro u otros epítopos extracelulares.

15 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 CXCR2 humano, células de mamífero que expresaban CXCR2 de cinomolgo, ADN que codificaba CXCR2 humano completo, ADN que codificaba CXCR2 humano $\Delta 1-17$, ADN que codificaba CXCR2 de cinomolgo y los péptidos expuestos en la Tabla 5.

20 El método de cribado tal como se ha descrito en la presente se puede llevar a cabo de cualquier forma adecuada, como será evidente para el experto. Se hace referencia, por ejemplo, a los documentos EP 0 542 810, WO 05/19824, WO 04/051268 y WO 04/106377. El cribado del paso b) se lleva a cabo preferentemente utilizando una técnica de citometría de flujo tal como FACS. Para ello, se hace referencia por ejemplo, a Lieby *et al.*, *Blood*, Vol. 97, N.º 12, 3820 (2001).

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

- 25 a) proporcionar un conjunto, selección o colección de secuencias de ácido nucleico que codifiquen el polipéptido;
- b) cribar dicho conjunto, selección o colección de secuencias de ácido nucleico para encontrar secuencias de ácido nucleico que codifiquen una secuencia de aminoácidos que se pueda unir a CXCR2 y/o tenga afinidad por él; y
- c) aislar dicha secuencia de ácido nucleico y después expresar dicho polipéptido.

30 En un método de este tipo, el conjunto, selección o colección de secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido puede ser, por ejemplo, un conjunto, selección o colección de secuencias de ácido nucleico que codifican un conjunto, selección o colección de secuencias de inmunoglobulina inmaduras; un conjunto, selección o colección de secuencias de ácido nucleico que codifican un conjunto, selección o colección de secuencias de inmunoglobulina sintéticas o semisintéticas; y/o un conjunto, selección o colección de secuencias de ácido nucleico que codifican un conjunto, selección o colección de secuencias de inmunoglobulina que se han sometido a maduración de afinidad.

35 Además, en dicho método, el conjunto, selección o colección de secuencias de ácido nucleico pueden codificar un conjunto, selección o colección 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, selección o colección de secuencias de ácido nucleico puede codificar un conjunto, selección o colección de anticuerpos de dominio o anticuerpos de dominio único, o un conjunto, selección o colección de secuencias de aminoácidos que sean capaces de funcionar como un anticuerpo de dominio o anticuerpo de dominio único.

40 En un aspecto preferido de este método, el conjunto, selección o colección de secuencias de ácido nucleico puede ser un conjunto, selección o colección de secuencias de ácido nucleico inmunitarias, por ejemplo, procedentes de un mamífero que se ha inmunizado adecuadamente con CXCR2 o con un determinante antigénico adecuado basado en él o procedente de él, tal como una parte, fragmento, región, dominio, bucle u otro epítipo antigénico de este. En un aspecto particular, dicho determinante antigénico puede ser una parte, región, dominio, bucle extracelular u otro u otros epítopos extracelulares.

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

50 En los métodos anteriores, el conjunto, selección o colección de secuencias de nucleótidos se pueden presentar en un fago, fagémido, ribosoma o microorganismo adecuado (tal como levadura) de modo que se facilite el cribado. Los métodos, técnicas y organismos hospedadores adecuados para presentar y cribar (un conjunto, selección o colección de) secuencias de nucleótidos que codifican secuencias de aminoácidos serán evidentes para el experto en la técnica, por ejemplo, basándose en la divulgación adicional en la presente. También se hace referencia a la revisión de

Hoogenboom en *Nature Biotechnology*, 23, 9, 1105-1116 (2005).

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

- 5 a) proporcionar un conjunto, selección o colección de secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos;
- b) cribar dicho conjunto, selección o colección de secuencias de ácido nucleico para encontrar secuencias de ácido nucleico que codifiquen una secuencia de aminoácidos que se pueda unir a CXCR2 y/o tener afinidad por él y que se bloquee de forma cruzada o bloquee de forma cruzada un Nanocuerpo biparatópico de la invención, p. ej., uno codificado por las SEQ ID N.ºs 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47 o 61; y
- c) aislar dicha secuencia de ácido nucleico y después expresar dicho polipéptido.

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

- El método anterior se puede llevar a cabo de cualquier forma adecuada, como será evidente para el experto y se discute en más detalle a continuación. Se hace referencia, por ejemplo, a los documentos EP 0 542 810, WO 05/19824, WO 04/051268 y WO 04/106377. Por ejemplo, el cribado del paso b) se lleva a cabo preferentemente utilizando una técnica de citometría de flujo tal como FACS. Para ello, se hace referencia, por ejemplo, a Lieby *et al.*, *Blood*, Vol. 97, N.º 12, 3820. Se hace particular referencia a la técnica denominada «Nanoclone™» descrita en la Solicitud internacional WO 06/079372 de Ablynx N.V.
- 20

- Otra técnica para obtener secuencias de V_{HH} o secuencias de Nanocuerpos dirigidas contra CXCR2 conlleva inmunizar de forma adecuada a un mamífero transgénico que sea capaz de expresar anticuerpos de cadena pesada (es decir, para generar una respuesta inmunitaria y/o anticuerpos de cadena pesada dirigidos contra CXCR2, con lo que se obtiene una muestra biológica adecuada a partir de dicho mamífero transgénico que contiene (secuencias de ácido nucleico que codifican) dichas secuencias de V_{HH} o secuencias de Nanocuerpos (tal como una muestra de sangre, una muestra de suero o una muestra de linfocitos B) y posteriormente generar secuencias de V_{HH} dirigidas contra CXCR2, a partir de dicha muestra, utilizando una técnica adecuada conocida de por sí (tal como cualquiera de los métodos descritos en la presente o una técnica de hibridomas). Por ejemplo, para este fin, se pueden utilizar ratones que expresan anticuerpos de cadena pesada y los métodos y técnicas adicionales descritos en los documentos WO 02/085945, WO 04/049794 y WO 06/008548 y Janssens *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 2006 10 de oct.;103(41):15130-5. Por ejemplo, dichos ratones que expresan anticuerpos de cadena pesada pueden expresar anticuerpos de cadena pesada con cualquier dominio variable (único) adecuado tal como dominios variables (únicos) de fuentes naturales (p. ej., dominios variables (únicos) humanos, dominios variables (únicos) de camélido o dominios variables (únicos) de tiburón), así como, por ejemplo, dominios variables (únicos) sintéticos o semisintéticos.
- 25
- 30
- 35

Otros métodos y técnicas adecuados para obtener los Nanocuerpos para su uso en la invención y/o ácidos nucleicos que los codifican, a partir de secuencias de V_H de origen natural o, preferentemente secuencias de V_{HH} , serán evidentes para el experto y pueden, por ejemplo, incluir las técnicas que se mencionan en la página 64 del documento WO 08/00279As mencionado en la presente.

- 40 Los dominios V_{HH} o Nanocuerpos pueden estar caracterizados por uno o más «residuos distintivos» dentro de sus FR. Los residuos distintivos son aquellos residuos que caracterizan la FR como procedente de un camélido, por ejemplo, origen de llama. Por consiguiente, los residuos distintivos son una diana deseable para una sustitución, preferentemente, una sustitución humanizante.

- De acuerdo con la numeración de Kabat, los residuos distintivos se pueden encontrar en las posiciones 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 o 108 en un Nanocuerpo. Algunos ejemplos no limitantes de (combinaciones adecuadas de) dichas secuencias de marco y residuos distintivos alternativos se proporcionan en las páginas 65 a 98 del documento WO 2008/020079. Otras secuencias humanizadas o parcialmente humanizadas conocidas en la técnica también se contemplan y engloban en la invención.
- 45

- Tal como se ha discutido ya en la presente, un Nanocuerpo para su uso en la invención puede tener al menos «una diferencia de aminoácido» (tal como se define en la presente) en al menos una de las regiones de marco en comparación con la región de marco correspondiente de un dominio V_H humano de origen natural y, en particular, en comparación con la región de marco correspondiente de DP-47. De forma más específica, de acuerdo con un aspecto no limitante de la invención, un Nanocuerpo puede tener al menos «una diferencia de aminoácido» (tal como se define en la presente) en al menos uno de los residuos distintivos (que incluyen los de las posiciones 108, 103 y/o 45), en comparación con la región de marco correspondiente de un dominio V_H humano de origen natural y, en particular, en
- 50
- 55

comparación con la región de marco correspondiente de DP-47. Habitualmente, un Nanocuerpo tendrá al menos una diferencia de aminoácido de este tipo con un dominio V_H de origen natural en al menos una de FR2 y/o FR4 y, en particular, al menos uno de los residuos distintivos en FR2 y/o FR4 (nuevamente, que incluyen los de las posiciones 108, 103 y/o 45).

Además, un Nanocuerpo humanizado de la invención puede ser tal como se define en la presente, pero con la condición de que tenga al menos «una diferencia de aminoácido» (tal como se define en la presente) en al menos una de las regiones de marco en comparación con la región de marco correspondiente de un dominio V_{HH} de origen natural. De forma más específica, de acuerdo con un aspecto no limitante de la invención, un Nanocuerpo humanizado o con la secuencia optimizada de otro modo puede ser tal como se define en la presente, pero con la condición de que tenga al menos «una diferencia de aminoácido» (tal como se define en la presente) al menos uno de los residuos distintivos (que incluyen los de las posiciones 108, 103 y/o 45) en comparación con la región de marco correspondiente de un dominio V_{HH} de origen natural. Habitualmente, un Nanocuerpo humanizado o con la secuencia optimizada de otro modo tendrá al menos una diferencia de aminoácido de este tipo con un dominio V_{HH} de origen natural en al menos una de FR2 y/o FR4 y, en particular, en al menos uno de los residuos distintivos en FR2 y/o FR4 (nuevamente, que incluyen los de las posiciones 108, 103 y/o 45).

Como será evidente a partir de la divulgación en la presente, también se encuentra dentro del alcance de la invención el uso de análogos, mutantes, variantes, alelos, homólogos y ortólogos naturales o sintéticos (denominados colectivamente en la presente como «análogos») del dominio variable único de inmunoglobulina de la invención tal como se define en la presente y, en particular, análogos de los Nanocuerpos biparatópicos de las SEQ ID N.ºs 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47, 61, 53, 54, 46, 69, 68, 67 o 66.

Por lo general, en dichos análogos, uno o más residuos de aminoácidos se han podido haber reemplazado, eliminado y/o añadido, en comparación con los dominios variables únicos de inmunoglobulina de la invención tal como se han definido en la presente. Dichas sustituciones, inserciones o delecciones se pueden llevar a cabo en una o más de las regiones de marco y/o en una o más de las CDR. Cuando dichas sustituciones, inserciones o delecciones se llevan a cabo en una o más de las regiones de marco, se pueden llevar a cabo en uno o más de los residuos distintivos y/o en una o más de las demás posiciones en los residuos de marco, aunque las sustituciones, inserciones o delecciones en los residuos distintivos se prefieren menos, por lo general (a menos que sean sustituciones humanizantes adecuadas tal como se describen en la presente).

A modo de ejemplos no limitantes, una sustitución puede ser, por ejemplo, una sustitución conservativa (tal como se describe en la presente) y/o un residuo de aminoácido se puede reemplazar por otro residuo de aminoácido que se encuentre presente de forma natural en la misma posición en otro dominio V_{HH} (remítase al documento WO 2008/020079 para consultar algunos ejemplos no limitantes de dichas sustituciones), aunque la invención generalmente no se limita a estos. Por tanto, cualesquiera una o más sustituciones, delecciones o inserciones o cualquier combinación de estas, que mejore las propiedades de, por ejemplo, un Nanocuerpo para su uso en un Nanocuerpo biparatópico de la invención o que al menos no menoscabe demasiado las propiedades deseadas o el equilibrio o combinación de propiedades deseadas de la invención (es decir, hasta el grado en que el Nanocuerpo o Nanocuerpo biparatópico deje de ser adecuado para su uso previsto) se incluyen dentro del alcance de la invención. Un experto será capaz generalmente de determinar y seleccionar sustituciones, delecciones o inserciones adecuadas, o combinaciones adecuadas de estas, basándose en la divulgación en la presente y, opcionalmente, después de un grado de experimentación rutinaria limitado, que puede conllevar, por ejemplo, la introducción de un número limitado de sustituciones posibles y la determinación de su influencia en las propiedades de los Nanocuerpos así obtenidos.

Por ejemplo, y en función del organismo hospedador utilizado para expresar el polipéptido o Nanocuerpo biparatópico de la invención, dichas delecciones y/o sustituciones se pueden diseñar de forma que se eliminen uno o más sitios para la modificación posterior a la traducción (tal como uno o más sitios de glicosilación), como será parte de la capacidad del experto en la técnica. Como alternativa, las sustituciones o inserciones se pueden diseñar de modo que introduzcan uno o más sitios para la unión de grupos funcionales (tal como se describe en la presente), por ejemplo, para permitir la pegilación sitioespecífica (nuevamente, tal como se describe en la presente).

Por lo general, en la presente, el hecho de favorecer las sustituciones, inserciones o delecciones en una secuencia de aminoácidos a efectos de garantizar propiedades o características estructurales particulares que no están presentes en la secuencia nativa, que incluyen sustituciones «humanizantes» se denomina «optimización de secuencia». A este respecto, se puede hacer referencia a la sección de definiciones en la presente en el apartado (y).

Los análogos son preferentemente tales que se puedan unir a CXCR2 con una afinidad (medida de forma adecuada y/o expresada como un valor de K_D (real o aparente), un valor de K_A (real o aparente), una velocidad k_a y/o una velocidad k_d o, como alternativa, como un valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en la presente) que es tal como se define en la presente para los Nanocuerpos biparatópicos de la invención.

Los análogos son preferentemente también de un modo tal que mantienen las propiedades favorables los Nanocuerpos biparatópicos, tal como se describen en la presente.

Además, de acuerdo con un aspecto preferido, los análogos tienen un grado de identidad de secuencia de al menos un 70%, preferentemente al menos un 80%, más preferentemente al menos un 90%, tal como al menos un 95% o un 99% o más; y/o preferentemente tienen como máximo 20, preferentemente como máximo 10, incluso más preferentemente como máximo 5, tal como 4, 3, 2 o solamente 1 diferencia de aminoácido (tal como se define en la presente) con uno de los Nanocuerpos biparatópicos de las SEQ ID N.^{os} 58, 59, 62, 63, 64, 65, 47, 61, 53, 54, 46, 69, 68, 67 o 66.

Además, las secuencias de marco y las CDR de los análogos son preferentemente tales que son acordes con los aspectos preferidos definidos en la presente. De forma más general, tal 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 preferentemente una E en la posición 44 y, más preferentemente, 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 V_{HH} o Nanocuerpos biparatópicos de la invención se han humanizado (es decir, en comparación con la secuencia de un Nanocuerpo de origen natural). Tal como se ha mencionado, dicha humanización conlleva generalmente reemplazar uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de un V_{HH} de origen natural con los residuos de aminoácidos que se encuentran presentes en las mismas posiciones en un dominio V_H humano tal como un dominio V_H3 humano. Algunos ejemplos de posibles sustituciones humanizantes aparte de las divulgadas específicamente en las Tablas 20, 22, 24, 26, 28 y 30 en la presente, aunque otras combinaciones de sustituciones humanizantes serán evidentes para el experto a partir de una comparación entre la secuencia de un Nanocuerpo y la secuencia de un dominio V_H humano de origen natural y a partir de la divulgación del documento WO 2008/020079 como ya se ha divulgado en la presente.

Por lo general, como resultado de la humanización, los dominios variables únicos de inmunoglobulina, en particular, los Nanocuerpos de la invención pueden llegar a ser «similares a los humanos», a la vez que mantienen aún las propiedades favorables de los Nanocuerpos de la invención tal como se han descrito en la presente. Como resultado, dichos Nanocuerpos humanizados pueden poseer varias ventajas tales como una inmunogenicidad reducida, en comparación con los dominios V_{HH} de origen natural correspondientes. Nuevamente, basándose en la divulgación en la presente y, opcionalmente, después de un grado de experimentación rutinaria limitado, el experto será capaz de llevar a cabo sustituciones humanizantes o 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} de origen natural, por otra parte.

Los Nanocuerpos para la incorporación en los Nanocuerpos biparatópicos de la invención se pueden humanizar de forma adecuada en cualquier residuo o residuos de marco, tal como en uno o más residuos distintivos (tal como se definen en la presente) o en uno o más residuos de marco diferentes (es decir, residuos no distintivos) o cualquier combinación adecuada de estos. Una sustitución humanizante preferida para los Nanocuerpos del «grupo P,R,S-103» o el «grupo KERE» es Q108 por L108. Los Nanocuerpos de la «clase GLEW» también se pueden humanizar mediante una sustitución de Q108 por L108, siempre que al menos uno de los demás residuos distintivos contenga una sustitución de camélido (camelizante) (tal como se define en la presente). Por ejemplo, tal como se ha mencionado anteriormente, una clase particularmente preferida de Nanocuerpos humanizados tiene una secuencia GLEW o similar a 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, y las secuencias de ácidos nucleicos que los codifican, se pueden proporcionar de cualquier forma conocida de por sí, por ejemplo, utilizando una o más de las técnicas mencionadas en las páginas 103 y 104 del documento WO 08/020079.

Tal como se menciona allí, también será evidente para el experto que los dominios variables únicos de inmunoglobulina de la invención (incluidos sus análogos) se pueden diseñar y/o preparar comenzando a partir de secuencias de V_H humanas (es decir, secuencias de aminoácidos o las secuencias de nucleótidos correspondientes) tal como, por ejemplo, a partir de secuencias de V_H3 humanas tales como DP-47, DP-51 o DP-29, es decir, introduciendo una o más sustituciones camelizantes (es decir, cambiando uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicho dominio V_H humano por los residuos de aminoácidos que se encuentran presentes en la posición correspondiente en un dominio V_{HH}), para proporcionar la secuencia de un Nanocuerpo de la invención y/o para conferir las propiedades favorables de un Nanocuerpo a la secuencia así obtenida. Nuevamente, esto se puede llevar a cabo generalmente utilizando los diversos métodos y técnicas a las que se hace referencia en el párrafo anterior, utilizando una secuencia de aminoácidos y/o secuencia de nucleótidos para un dominio V_H humano como punto de partida.

Algunas sustituciones camelizantes preferidas, pero sin carácter limitante, se pueden obtener a partir del documento WO 2008/020079. También será evidente que las sustituciones camelizantes en uno o más de los residuos distintivos tendrán generalmente una influencia mayor en las propiedades deseadas que las sustituciones en una o más de las demás posiciones de aminoácidos, aunque ambas y cualquier combinación adecuada de ellas están incluidas 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 posteriormente introducir sustituciones camelizantes adicionales

que mejoren adicionalmente dichas propiedades y/o confieran propiedades favorables adicionales. Nuevamente, el experto será capaz generalmente de determinar y seleccionar sustituciones camelizantes adecuadas o combinaciones de sustituciones camelizantes adecuadas, basándose en la divulgación en la presente y, opcionalmente, después de un grado de experimentación rutinaria limitado, que puede conllevar, por ejemplo, la introducción de un número limitado de sustituciones camelizantes posibles y la determinación de si las propiedades favorables de los dominios variables únicos de inmunoglobulina se obtienen o mejoran (es decir, en comparación con el dominio V_H original). Sin embargo, por lo general, dichas sustituciones camelizantes son preferentemente tales que la secuencia de aminoácidos resultante contenga al menos (a) una Q en la posición 108; y/o (b) un aminoácido cargado o un residuo de cisteína en la posición 45 y, preferentemente, también una E en la posición 44 y, más preferentemente, 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. Mas preferentemente, las sustituciones camelizantes son tales que dan como resultado un dominio variable único de inmunoglobulina para su uso en la invención y/o en un análogo de este (tal como se define en la presente), tal como en un análogo humanizado y/o preferentemente en un análogo que sea tal como se ha definido en los párrafos anteriores.

Los dominios variables únicos de inmunoglobulina tales como Nanocuerpos también se pueden obtener a partir de dominios V_H mediante la incorporación de sustituciones que sean escasas en la naturaleza, pero no obstante, estructuralmente compatibles con el plegamiento del dominio V_H. Por ejemplo, pero sin carácter limitante, estas sustituciones pueden incluir una o más de las 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 Feb. de 2008;283(6):3639-54. Epub 28 de Nov. de 2007).

La invención también comprende derivados de los polipéptidos biparatópicos de la invención. Dichos derivados se pueden obtener generalmente por modificación y, en particular, por modificación química y/o biológica (p. ej., enzimática), de los polipéptidos biparatópicos de la invención y/o uno o más de los residuos de aminoácidos que forman los polipéptidos biparatópicos de la invención.

Algunos ejemplos de dichas modificaciones, así como ejemplos de residuos de aminoácidos dentro de la secuencia polipeptídica que se pueden modificar de tal manera (es decir, en el esqueleto proteico, pero preferentemente en una cadena lateral), los métodos y técnicas que se pueden utilizar para introducir dichas modificaciones y los usos y ventajas potenciales de dichas modificaciones serán evidentes para el experto.

Por ejemplo, una modificación de este tipo puede conllevar la introducción (p. ej., mediante unión covalente o de otra manera adecuada) de uno o más grupos funcionales, residuos o restos en o sobre el polipéptido biparatópico de la invención y, en particular, de uno o más grupos funcionales, residuos o restos que confieran una o más propiedades o funcionalidades deseadas al polipéptido biparatópico de la invención. Algún ejemplo de dichos grupos funcionales será evidente para el experto.

Por ejemplo, dicha modificación puede comprender la introducción (p. ej., mediante unión covalente o de cualquier otra forma adecuada) de uno o más grupos funcionales que aumenten la semivida, 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 cualesquiera efectos secundarios indeseados del polipéptido de la invención y/o que confieran otras propiedades ventajosas y/o reduzcan las propiedades no deseadas de los polipéptidos y/o Nanocuerpos biparatópicos de la invención; o cualquier combinación de dos o más de los anteriores. Algunos ejemplos de dichos grupos funcionales y técnicas para introducirlos serán evidentes para el experto y pueden comprender generalmente todos los grupos funcionales conocidos en la técnica, así como los grupos funcionales y técnicas conocidas de por sí para la modificación de proteínas farmacéuticas y, en particular, para la modificación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (que incluyen anticuerpos de dominio único y de ScFv), para los cuales se hace referencia, por ejemplo, a *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16^a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980). Dichos grupos funcionales pueden, por ejemplo, conectarse directamente (por ejemplo, covalentemente) a un polipéptido biparatópico de la invención u opcionalmente a través de un conector o espaciador adecuado, como será nuevamente evidente para el experto.

Otra modificación, normalmente menos preferida comprende la glicosilación unida en N o unida en O, normalmente como parte de una modificación conjunta con la traducción y/o posterior a la traducción, dependiendo de la célula hospedadora utilizada para expresar el polipéptido o Nanocuerpo biparatópico de la invención.

Otra modificación más puede comprender la introducción de una o más marcas u otros grupos o restos generadores de señales detectables, dependiendo del uso previsto del polipéptido o Nanocuerpo marcado. Las marcas y técnicas para unirlos, usarlos y detectarlos adecuados serán evidentes para el experto y, por ejemplo, incluyen, sin carácter limitante, las marcas fluorescentes, marcas fosforescentes, marcas quimioluminiscentes, marcas bioluminiscentes, radioisótopos, metales, quelatos metálicos, cationes metálicos, cromóforos y enzimas tales como los mencionados en la página 109 del documento WO 08/020079. Otras marcas adecuadas serán evidentes para el experto y, por ejemplo, incluyen restos que se pueden detectar utilizando espectroscopía RMN o REE.

Dichos Nanocuerpos y polipéptidos biparatópicos de la invención marcados se pueden utilizar, por ejemplo, para ensayos *in vitro*, *in vivo* o *in situ* (que incluyen inmunoensayos conocidos de por sí tales como ELISA, RIA, EIA y otros «ensayos sándwich», etc.), así como fines de diagnóstico e imagen *in vivo*, dependiendo de la elección de la marca específica.

- 5 Tal como será evidente para el experto, otra modificación puede conllevar la introducción de un grupo quelante, por ejemplo, para formar quelatos con uno de los metales o cationes metálicos mencionados anteriormente. Los grupos quelantes adecuados incluyen, por ejemplo, sin carácter limitante, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

- 10 Otra modificación más puede comprender la introducción de un grupo funcional que sea una parte de un par de unión específico tal como el par de unión biotina-(estrep)avidina. Un grupo funcional de este tipo se puede utilizar para conectar el polipéptido o Nanocuerpo biparatópico de la invención con otra proteína, polipéptido o compuesto químico que esté unido a la otra mitad del par de unión, es decir, mediante la formación del par de unión. Por ejemplo, un Nanocuerpo biparatópico de la invención puede conjugarse con biotina y conectarse a otra proteína, polipéptido, compuesto o portador conjugado con avidina o estreptavidina. Por ejemplo, un Nanocuerpo biparatópico conjugado
15 de este tipo se puede utilizar como indicador, por ejemplo, en un sistema diagnóstico donde un agente que produce una señal detectable se conjuga con avidina o estreptavidina. Dichos pares de unión se pueden utilizar, por ejemplo, para unir el Nanocuerpo biparatópico de la invención a un portador, incluidos portadores adecuados para fines farmacéuticos. Un ejemplo no limitante son las formulaciones liposomales descritas por Cao y Suresh, *Journal of Drug Targeting*, 8, 4, 257 (2000). Dichos pares de unión también se pueden utilizar para conectar un agente
20 terapéuticamente activo al Nanocuerpo de la invención.

- Para algunas aplicaciones, en particular, para aquellas aplicaciones en las que se pretende destruir una célula que exprese la diana CXCR2 contra la cual se dirigen los polipéptidos o dominios variables únicos de inmunoglobulina biparatópicos de la invención (p. ej., en el tratamiento del cáncer) o para reducir o ralentizar el crecimiento y/o la proliferación de una célula de este tipo, los polipéptidos biparatópicos de la invención también se pueden conectar a
25 una toxina o a un residuo o resto tóxico. Algunos ejemplos de restos, compuestos o residuos tóxicos que se pueden conectar con un polipéptido biparatópico de la invención para proporcionar, por ejemplo, un compuesto citotóxico serán evidentes para el experto y se pueden encontrar, por ejemplo, en la técnica anterior citada anteriormente y/o en la descripción adicional en la presente. Un ejemplo es la tecnología denominada ADEPT™ descrita en el documento WO 03/055527.

- 30 Otras modificaciones químicas y enzimáticas potenciales serán evidentes para el experto. Dichas modificaciones también se pueden introducir para fines de investigación (p. ej., para estudiar las relaciones función-actividad). Se hace referencia, por ejemplo, a Lundblad y Bradshaw, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 26, 143-151 (1997).

- Preferentemente, los derivados son tales que se unen a CXCR2 con una afinidad (medida y/o expresada adecuadamente como un valor de K_D (real o aparente), un valor de K_A (real o aparente), una velocidad k_a y/o una
35 velocidad k_d , o como alternativa, como un valor de CI_{50} , tal como se describe adicionalmente en la presente) que es tal como se define en la presente para los Nanocuerpos biparatópicos de la invención.

- Tal como se ha mencionado anteriormente, la invención también se refiere a proteínas o polipéptidos que están esencialmente compuestos o que comprenden al menos un polipéptido biparatópico de la invención. Se pretende que la expresión «compuesto esencialmente por» se refiera a que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la
40 invención es exactamente igual a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido biparatópico de la invención o corresponde a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de este tipo de la invención que tiene un número limitado de residuos de aminoácidos tal como 1-20 residuos de aminoácidos, por ejemplo, 1-10 residuos de aminoácidos y preferentemente 1-6 residuos de aminoácidos tal como 1, 2, 3, 4, 5 o 6 residuos de aminoácidos, añadidos en el extremo amino terminal, en el extremo carboxi terminal, o tanto en el extremo amino terminal como en el extremo
45 carboxi terminal de la secuencia de aminoácidos del polipéptido biparatópico.

Dichos residuos de aminoácidos pueden o no modificar, alterar o influir de otro modo las propiedades (biológicas) del polipéptido y pueden añadir o no una funcionalidad adicional a este. Por ejemplo, dichos residuos de aminoácido:

- pueden comprender un residuo de Met N terminal, por ejemplo, como resultado de la expresión en una célula hospedadora u organismo hospedador heterólogo.
- 50 – pueden formar una secuencia de señalización o secuencia líder que controle la secreción del polipéptido biparatópico desde una célula hospedadora tras la síntesis. Algunos péptidos líder secretorios adecuados serán evidentes para el experto, y pueden ser tal como se describen adicionalmente en la presente. Habitualmente, una secuencia líder de este tipo se conectará con el extremo N terminal del polipéptido biparatópico;
- puede formar una secuencia o señal que permita que el polipéptido biparatópico se dirija hacia organismos, tejidos,
55 células o partes o compartimentos de células específicos y/o penetre o se introduzca en ellos, y/o que permita que el polipéptido biparatópico penetre o atraviese una barrera biológica tal como una membrana celular, una capa de

células tal como una capa de células epiteliales, un tumor que incluye tumores sólidos o la barrera hematoencefálica. Algunos ejemplos de dichas secuencias de aminoácidos serán evidentes para el experto e incluyen las mencionadas en el párrafo c) en la página 112 del documento WO 08/020079.

- puede formar una «etiqueta», por ejemplo, una secuencia de aminoácidos o residuo que permita o facilite la purificación del Nanocuerpo biparatópico, por ejemplo, utilizando técnicas de afinidad dirigidas contra dicha secuencia o residuo. Después, dicha secuencia o residuo se puede eliminar (p. ej., mediante escisión química o enzimática) para proporcionar la secuencia del polipéptido biparatópico (para este fin, la etiqueta puede estar conectada opcionalmente a la secuencia del polipéptido biparatópico mediante una secuencia conectora escindible o contener un motivo escindible). Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, de dichos residuos son múltiples residuos de histidina, residuos de glutatión y una etiqueta myc (remítase, por ejemplo, a la SEQ ID N.º 31 del documento WO 06/12282).
- puede ser uno o más residuos de aminoácidos que se hayan funcionalizado y/o que puedan servir como un sitio para la incorporación de grupos funcionales. Los residuos de aminoácidos y grupos funcionales adecuados serán evidentes para el experto e incluyen, sin carácter limitante, los residuos de aminoácidos y grupos funcionales mencionados en la presente para los derivados de los polipéptidos o Nanocuerpos biparatópicos 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, para proporcionar una proteína de fusión que comprende dicho Nanocuerpo biparatópico de la invención y el o los péptidos o polipéptidos adicionales. Una fusión de este tipo también se denominará en la presente «fusión de Nanocuerpo».

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

Por ejemplo, el péptido o polipéptido adicional puede proporcionar también un sitio de unión adicional, donde el sitio de unión se puede dirigir contra cualquier proteína, polipéptido, antígeno, determinante antigénico o epítipo deseado (que incluye, sin carácter limitante, la misma proteína, polipéptido, antígeno, determinante antigénico o epítipo contra el cual se dirige el polipéptido biparatópico de la invención, o una proteína, polipéptido, antígeno, determinante antigénico o epítipo diferente).

Algún ejemplo de dichos péptidos o polipéptidos será evidente para el experto y puede comprender generalmente todas las secuencias de aminoácidos que se utilizan en las fusiones peptídicas basadas en anticuerpos convencionales y fragmentos de estos (que incluyen, sin carácter limitante, anticuerpos de dominio único y de ScFv). Se hace referencia, por ejemplo, a la revisión de Holliger y Hudson, *Nature Biotechnology*, 23, 9, 1126-1136 (2005).

Por ejemplo, un péptido o polipéptido de este tipo puede ser una secuencia de aminoácidos que aumente la semivida, la solubilidad o la absorción, reduzca la inmunogenicidad o la toxicidad, elimine o atenúe efectos secundarios indeseables y/o confiera otras propiedades ventajosas y/o reduzca las propiedades no deseadas de los polipéptidos de la invención, en comparación con el polipéptido de la invención por sí mismo. Algunos ejemplos no limitantes de dichos péptidos y polipéptidos son seroproteínas tales como seroalbúmina humana (remítase, por ejemplo, al documento WO 00/27435) o moléculas hapténicas (por ejemplo, haptenos que son reconocidos por anticuerpos circulantes, remítase, por ejemplo, al documento WO 98/22141).

En particular, se ha descrito en la técnica que la conexión de fragmentos de inmunoglobulinas (tales como dominios V_H) a seroalbúmina o a fragmentos de esta se puede utilizar para aumentar la semivida. Se hace referencia, por ejemplo, a los documentos WO 00/27435 y WO 01/077137). De acuerdo con la invención, los polipéptidos biparatópicos, preferentemente el Nanocuerpo biparatópico de la invención se conecta, de forma preferente, directamente a seroalbúmina (o a un fragmento adecuado de esta) o mediante un conector adecuado y, en particular, mediante un péptido adecuado conectado de modo que el polipéptido de la invención se pueda expresar como una (proteína) de fusión genética. De acuerdo con un aspecto específico, el Nanocuerpo biparatópico de la invención se puede conectar a un fragmento de seroalbúmina que comprenda al menos el dominio III de seroalbúmina o parte de este. Se hace referencia, por ejemplo, al documento WO 07/112940 de Ablynx N.V.

Como alternativa, tal como se ha discutido ya en la presente, el péptido o polipéptido adicional puede proporcionar un sitio de unión o unidad de unión adicional que se dirija contra una seroproteína (tal como, por ejemplo, seroalbúmina humana u otra seroproteína tal como IgG), para proporcionar una semivida aumentada en suero. Dichas secuencias de aminoácidos, por ejemplo, incluyen los Nanocuerpos descritos más adelante, así como los péptidos y las proteínas de unión de bajo peso molecular descritos en los documentos WO 91/01743, WO 01/45746 y WO 02/076489 y los dAb descritos en los documentos WO 03/002609 y WO 04/003019. También se hace referencia a Harmsen *et al.*, *Vaccine*, 23 (41): 4926-42, 2005, así como al documento EP 0 368 684, así como a los documentos WO 08/028977, WO 08/043821, WO 08/043822 de Ablynx N.V. y la Solicitud provisional de EE. UU. de Ablynx N.V. Titulada "*Peptides capable of binding to serum proteins*" presentada el 5 de diciembre de 2006 (remítase también al documento WO2008/068280).

Dichos péptidos o polipéptidos se pueden dirigir, en particular, contra seroalbúmina (y más en particular seroalbúmina humana) y/o contra IgG (y más en particular IgG humana). Por ejemplo, dichas secuencias de aminoácidos pueden ser secuencias de aminoácidos que se dirijan contra seroalbúmina (humana) y secuencias de aminoácidos que se puedan unir a residuos de aminoácidos en la seroalbúmina (humana) que no estén implicados en la unión de la seroalbúmina a FcRn (remítase, por ejemplo, al documento WO 06/0122787) y/o secuencias de aminoácidos que sean capaces de unirse a residuos de aminoácidos en la seroalbúmina que no formen parte del dominio III de la seroalbúmina (remítase de nuevo, por ejemplo, al documento WO 06/0122787); secuencias de aminoácidos que tengan o puedan proporcionar una semivida aumentada (remítase, por ejemplo, al documento WO 08/028977 de Ablynx N.V.); secuencias de aminoácidos contra la seroalbúmina humana que reaccionen de forma cruzada con seroalbúmina de al menos una especie de mamífero y, en particular, con al menos una especie de primate (tal como, sin carácter limitante, monos del género *Macaca* (tal como, en particular, macacos cinomolgos (*Macaca fascicularis*) y/o macacos rhesus (*Macaca mulatta*) y babuino (*Papio ursinus*), se hace referencia de nuevo al documento WO 08/028977; secuencias de aminoácidos que se puedan unir a seroalbúmina de una manera independiente del pH (remítase, por ejemplo, al documento WO 08/043821 de Ablynx N.V. titulado "*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 son ligantes condicionales (remítase, por ejemplo, al documento WO 08/043822 de Ablynx N.V. titulado "*Amino acid sequences that bind to a desired molecule in a conditional manner*").

De acuerdo con otro aspecto, la o las secuencias peptídicas, polipeptídicas o proteicas adicionales pueden comprender una o más partes, fragmentos o dominios de anticuerpos de 4 cadenas convencionales (y, en particular, anticuerpos humanos) y/o anticuerpos de cadena pesada. Por ejemplo, aunque habitualmente menos preferido, un Nanocuerpo biparatópico de la invención se puede conectar a un dominio V_H o V_L convencional (preferentemente humano) o a un análogo natural o sintético de un dominio V_H o V_L, de nuevo opcionalmente a través de una secuencia conectora (que incluye, sin carácter limitante, otros anticuerpos de dominio (único) tales como los dAb descritos por Ward *et al.*).

El polipéptido o Nanocuerpo biparatópico de la invención también se puede conectar a uno o más dominios C_H1, C_H2 y/o C_H3 (preferentemente humanos), opcionalmente mediante una secuencia conectora. Por ejemplo, un Nanocuerpo biparatópico conectado a un dominio C_H1 adecuado se podría utilizar, por ejemplo, junto con cadenas ligeras adecuadas, para generar fragmentos/estructuras de anticuerpos análogos a los fragmentos Fab o fragmentos F(ab')₂ convencionales, pero en los que uno o (en caso de un fragmento F(ab')₂) uno o los dos dominios V_H convencionales se hayan reemplazado con un Nanocuerpo biparatópico de la invención. Además, se podrían conectar dos polipéptidos biparatópicos a un dominio C_H3 (opcionalmente mediante un conector) para proporcionar un constructo con una semivida aumentada *in vivo*.

De acuerdo con un aspecto específico de un polipéptido de la invención, uno o más polipéptidos o Nanocuerpos biparatópicos de la invención se podrían conectar (opcionalmente mediante un conector o región de bisagra adecuados) 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 anticuerpo que confieran una o mas funciones efectoras al polipéptido de la invención y/o puedan conferir la capacidad de unirse a uno o más receptores de Fc. Por ejemplo, para este fin, y sin limitarse a este, el o los péptidos o polipéptidos adicionales pueden comprender uno o más dominios C_H2 y/o C_H3 de un anticuerpo tal como de un anticuerpo de cadena pesada (tal como se describe en la presente) y, más preferentemente, de un anticuerpo de 4 cadenas humano convencional y/o pueden formar (parte de) una región Fc, por ejemplo, de IgG (p. ej., de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), de IgE o de otra Ig humana tal como IgA, IgD o IgM. Por ejemplo, el documento WO 94/04678 describe anticuerpos de cadena pesada que comprenden un dominio V_{HH} de camélido o un derivado humanizado de este (es decir, un Nanocuerpo), en el cual el dominio C_H2 y/o C_H3 de camélido se han reemplazado por dominios C_H2 y C_H3 humanos, para proporcionar una inmunoglobulina compuesta por 2 cadenas pesadas que comprenden un Nanocuerpo y dominios C_H2 y C_H3 humanos (pero ningún dominio C_H1), donde la inmunoglobulina tiene la función efectora proporcionada por los dominios C_H2 y C_H3 y donde la inmunoglobulina puede funcionar sin la presencia de ninguna cadena ligera. Otras secuencias de aminoácidos que se pueden conectar de forma adecuada a los Nanocuerpos de la invención para proporcionar una función efectora serán evidentes para el experto, y se pueden elegir basándose en la o las funciones efectoras deseadas. Se hace referencia, por ejemplo, a los documentos WO 04/058820, WO 99/42077, WO 02/056910 y WO 05/017148, así como a la revisión de Holliger y Hudson, *supra*. El acoplamiento de un polipéptido, por ejemplo, un Nanocuerpo de la invención a una porción Fc también puede dar lugar a una semivida aumentada, en comparación con el polipéptido correspondiente de la invención. Para algunas aplicaciones, el uso de una porción Fc y/o dominios constantes (es decir, dominios C_H2 y/o C_H3) que confieren una semivida aumentada sin ninguna función efectora biológicamente significativa también pueden ser adecuados o incluso preferidos. Otros constructos adecuados que comprenden uno o más polipéptidos biparatópicos tales como Nanocuerpos y uno o más dominios constantes con una semivida aumentada *in vivo* serán evidentes para el experto y pueden comprender, por ejemplo, dos Nanocuerpos conectados a un dominio C_H3, opcionalmente mediante una secuencia conectora. Generalmente, cualquier proteína de fusión o derivados con semivida aumentada tendrán preferentemente un peso molecular superior a 50 kD, el valor límite para la absorción renal.

En otro aspecto específico, pero no limitante, con el fin de formar un polipéptido de la invención, una o más secuencias

de aminoácidos de la invención se pueden conectar (opcionalmente mediante un conector o región de bisagra adecuados) a dominios constantes de origen natural, sintéticos o semisintéticos (o análogos, variantes, mutantes, partes o fragmentos de estos) que tienen una tendencia reducida (o esencialmente nula) a autoasociarse en forma de dímeros (es decir, en comparación con dominios constantes que se encuentran presentes de forma natural en anticuerpos de 4 cadenas convencionales). Dichas variantes de cadenas Fc monoméricas (es decir, que no se autoasocian), o fragmentos de estas, serán evidentes para el experto. Por ejemplo, Helm *et al.*, *J Biol Chem* 1996 271 7494, describen variantes de cadenas Fc monoméricas que se pueden utilizar en las cadenas polipeptídicas de la invención.

Además, dichas variantes de cadenas Fc monoméricas son preferentemente tales que aún son capaces de unirse al complemento o el o los receptores de Fc relevantes (dependiendo de la porción Fc de la que procedan), y/o tales que aún poseen algunas o todas las funciones efectoras de la porción Fc de la que proceden (o en un nivel reducido aún adecuado para el uso previsto). Como alternativa, en una cadena polipeptídica de la invención de este tipo, la cadena de Fc monomérica se puede utilizar para conferir una semivida aumentada a la cadena polipeptídica, en cuyo caso la cadena de Fc monomérica también puede tener funciones efectoras nulas o esencialmente nulas.

Los péptidos o polipéptidos adicionales también pueden formar una secuencia de señalización o secuencia líder que controle la secreción del Nanocuerpo o el polipéptido biparatópico de la invención desde una célula hospedadora tras la síntesis (por ejemplo, para proporcionar una pre-, pro- o preproforma del polipéptido de la invención, dependiendo de la célula hospedadora utilizada para expresar el polipéptido de la invención).

El péptido o polipéptido adicional también puede formar una secuencia o señal que permita que el Nanocuerpo o polipéptido biparatópico de la invención se dirija hacia órganos, tejidos, células o partes o compartimentos de células específicos y/o penetre o entre en ellos; y/o que permita que el Nanocuerpo o polipéptido biparatópico de la invención penetre o atraviese una barrera biológica tal como una membrana celular, una capa de células tal como una capa de células epiteliales, un tumor que incluye tumores sólidos o la barrera hematoencefálica. Algunos ejemplos adecuados de dichas secuencias de aminoácidos serán evidentes para el experto y, por ejemplo, incluyen, sin carácter limitante, los mencionados en la página 118 del documento WO 08/020079. Para algunas aplicaciones, en particular, para aquellas aplicaciones en las que se pretende destruir una célula que expresa la diana contra la que se dirigen los polipéptidos biparatópicos de la invención (p. ej., en el tratamiento del cáncer) o para reducir o ralentizar el crecimiento y/o la proliferación de una célula de este tipo, los polipéptidos biparatópicos de la invención también se pueden conectar a una proteína o polipéptido (cito)tóxico. Algunos ejemplos de dichas proteínas y polipéptidos tóxicos que se pueden conectar a un Nanocuerpo de la invención para proporcionar, por ejemplo, un polipéptido citotóxico de la invención serán evidentes para el experto y se pueden encontrar, por ejemplo, en la técnica anterior citada anteriormente y/o en la descripción adicional en la presente. Un ejemplo es la tecnología denominada ADEPT™ descrita en el documento WO 03/055527.

De acuerdo con un aspecto opcional, pero no limitante, dichos uno o más péptidos o polipéptidos adicionales comprenden al menos un Nanocuerpo adicional, para proporcionar un polipéptido de la invención que comprende al menos tres, tal como cuatro, cinco o más Nanocuerpos, en los cuales dichos Nanocuerpos se pueden conectar opcionalmente mediante una o más secuencias conectoras (tal como se definen en la presente).

Finalmente, también se encuentra dentro del alcance de la invención que los polipéptidos biparatópicos de la invención puedan contener dos o más Nanocuerpos y uno o más péptidos o polipéptidos adicionales (tal como se mencionan en la presente).

Para los polipéptidos multivalentes y multiespecíficos que contienen dos o más dominios V_{HH} y su preparación, se hace referencia a Conrath *et al.*, *J. Biol. Chem.*, Vol. 276, 10. 7346-7350, 2001; Muyldermans, *Reviews in Molecular Biotechnology* 74 (2001), 277-302; así como, por ejemplo, a los documentos WO 96/34103 y WO 99/23221. Algunos ejemplos diferentes de algunos polipéptidos multiespecíficos y/o multivalentes específicos de la invención se pueden encontrar en las solicitudes de Ablynx N. V. mencionadas 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 posibilita una semivida aumentada. Dichos Nanocuerpos pueden ser, por ejemplo, Nanocuerpos que se dirigen contra una seroproteína y, en particular, una seroproteína humana tal como seroalbúmina humana, proteína de unión a tiroxina, transferrina (humana), fibrinógeno, una inmunoglobulina tal como IgG, IgE o IgM, o contra una de las seroproteínas enumeradas en el documento WO 04/003019. De estos, los Nanocuerpos que se pueden unir a seroalbúmina (y, en particular, seroalbúmina humana) o a IgG (y, en particular, IgG humana, remítase, por ejemplo, al Nanocuerpo VH-1 descrito en la revisión de Muyldermans, *supra*) son particularmente preferidos (aunque, por ejemplo, para los experimentos en ratones o primates, se pueden utilizar Nanocuerpos contra o que reaccionan de forma cruzada con seroalbúmina de ratón (MSA) o seroalbúmina de dicho primate, respectivamente. Sin embargo, para el uso farmacéutico, se preferirán habitualmente los Nanocuerpos contra seroalbúmina humana o IgG humana). Los Nanocuerpos que posibilitan una semivida aumentada y que se pueden utilizar en los polipéptidos de la invención incluyen los Nanocuerpos dirigidos contra seroalbúmina que se describen en el documento WO 04/041865, en el documento WO 06/122787 y en las solicitudes de patente adicionales

de Ablynx N.V., tales como los mencionados anteriormente.

Por ejemplo, algunos Nanocuerpos preferidos que posibilitan una semivida aumentada para su uso en la presente invención incluyen Nanocuerpos que se pueden unir a residuos de aminoácidos en seroalbúmina (humana) que no están implicados en la unión de seroalbúmina a FcRn (remítase a, por ejemplo, al documento WO 06/0122787); los Nanocuerpos que son capaces de unirse a residuos de aminoácidos en la seroalbúmina que no forman parte del dominio III de seroalbúmina (remítase, por ejemplo, al documento WO 06/0122787); los Nanocuerpos que poseen o pueden proporcionar una semivida aumentada (remítase, por ejemplo, al documento WO 08/028977 de Ablynx N.V. mencionado en la presente); los Nanocuerpos contra la seroalbúmina humana que reaccionan de forma cruzada con seroalbúmina de al menos una especie de mamífero y, en particular, con al menos una especie de primate (tal como, sin carácter limitante, monos del género *Macaca* (tal como, y en particular, macacos cinomolgos (*Macaca fascicularis*) y/o macacos rhesus (*Macaca mulatta*)) y babuino (*Papio ursinus*)) (remítase, por ejemplo, al documento WO 08/028977 de Ablynx N.V.); los Nanocuerpos que se pueden unir a seroalbúmina de una forma independiente del pH (remítase, por ejemplo, al documento WO2008/043821 de Ablynx N.V. mencionado en la presente) y/o Nanocuerpos que son ligantes condicionales (remítase, por ejemplo, al documento WO 08/043822 de Ablynx N.V.).

Algunos Nanocuerpos particularmente preferidos que posibilitan una semivida aumentada y que se pueden utilizar en los polipéptidos de la invención incluyen los Nanocuerpos ALB-1 a ALB-10 divulgados en el documento WO 06/122787 (remítase a las Tablas II y III) de los cuales ALB-8 (SEQ ID NO: 62 en el documento WO 06/122787) es particularmente preferido.

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 seroalbúmina humana.

Algunos péptidos o polipéptidos adicionales que se pueden añadir o unir o fusionar a los polipéptidos biparatópicos de la invención incluyen un polímero compuesto por Prolina, Alanina y Serina (una secuencia PAS). Las secuencias PAS pueden estar compuestas por 200-600 residuos y dar lugar a un volumen hidrodinámico drásticamente mayor que da como resultado una prolongación de la semivida en plasma. La semivida en suero de los polipéptidos biparatópicos de la invención también se puede extender mediante fusión con un polipéptido de 864 aminoácidos denominado XTEN tal como se describe en Schellenbrger *et al.*, (2009), *Nature Biotechnology* 27, N.º 12, p1186-1190.

Por lo general, cualesquiera polipéptidos de la invención con semivida aumentada que contienen uno o más Nanocuerpos biparatópicos de la invención y cualesquiera derivados de los Nanocuerpos biparatópicos de la invención o de dichos polipéptidos que tienen una semivida aumentada, preferentemente tienen una semivida que es al menos 1.5 veces, preferentemente al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo, al menos 10 veces o más de 20 veces, superior a la semivida del Nanocuerpo correspondiente de la invención por sí mismo. Por ejemplo, un derivado de este tipo o polipéptidos con semivida aumentada pueden tener una semivida que se aumenta en más de 1 hora, preferentemente más de 2 horas, más preferentemente más de 6 horas, tal como más de 12 horas, o incluso más de 24, 48 o 72 horas, en comparación con el Nanocuerpo correspondiente de la invención por sí mismo.

En un aspecto preferido, pero no limitante, de la invención, dichos derivados o polipéptidos pueden presentar una semivida en suero en seres humanos de al menos aproximadamente 12 horas, preferentemente al menos 24 horas, más preferentemente al menos 48 horas, incluso más preferentemente al menos 72 horas o más. Por ejemplo, dichos derivados o polipéptidos pueden tener una semivida de al menos 5 días (tal como aproximadamente de 5 a 10 días), preferentemente al menos 9 días (tal como aproximadamente de 9 a 14 días), más preferentemente al menos aproximadamente 10 días (tal como aproximadamente de 10 a 15 días) o al menos aproximadamente 11 días (tal como aproximadamente de 11 a 16 días), más preferentemente al menos aproximadamente 12 días (tal como aproximadamente de 12 a 18 días o más), o más de 14 días (tal como aproximadamente de 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 al polipéptido de la invención hacia órganos, tejidos, células, o partes o compartimentos de células específicos, y/o que permite que el polipéptido de la invención penetre o entre en ellos; y/o que permite que el Nanocuerpo penetre o atraviese una barrera biológica tal como una membrana celular, una capa de células tal como una capa de células epiteliales, un tumor que incluye tumores sólidos o la barrera hematoencefálica. Algunos ejemplos de dichos Nanocuerpos incluyen Nanocuerpos que se dirigen hacia epítomos, marcadores o proteínas de la superficie celular específicos del órgano, tejido o célula deseado (por ejemplo, marcadores de la superficie celular asociados con células tumorales), y los fragmentos de anticuerpo dirigidos al cerebro de dominio único descritos en los documentos WO 02/057445 y WO 06/040153, de los cuales FC44 (SEQ ID NO: 189 del documento WO 06/040153) y FC5 (SEQ ID NO: 190 del documento WO 06/040154) son ejemplos preferidos.

En los polipéptidos de la invención, los dos o más Nanocuerpos y el uno o más polipéptidos se pueden conectar directamente entre sí (tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 99/23221) y/o se pueden conectar entre sí mediante uno o más espaciadores o conectores adecuados, o cualquier combinación de estos.

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

Las secuencias de aminoácidos, Nanocuerpos biparatópicos, polipéptidos y ácidos nucleicos de la invención se pueden preparar de una manera conocida de por sí, como será evidente para el experto a partir de la descripción adicional en la presente. Por ejemplo, los polipéptidos y Nanocuerpos biparatópicos de la invención se pueden preparar de cualquier manera conocida de por sí para la preparación de anticuerpos y, en particular, para la preparación de fragmentos de anticuerpos (que incluyen, sin carácter limitante, anticuerpos de dominio (único) y fragmentos ScFv). Algunos métodos preferidos, pero no limitantes, para preparar las secuencias de aminoácidos, Nanocuerpos, polipéptidos y ácidos nucleicos incluyen los métodos y técnicas descritos en la presente.

Como será evidente para el experto, un método particularmente útil para preparar un Nanocuerpo biparatópico y/o un polipéptido de la invención comprende generalmente los pasos de:

- i) la expresión, en una célula hospedadora u organismo hospedador adecuado (también denominado en la presente como un «hospedador de la invención») o en otro sistema de expresión adecuado de un ácido nucleico que codifique dicho polipéptido o Nanocuerpo biparatópico de la invención (también denominado en la presente como un «ácido nucleico de la invención»), opcionalmente seguida de:
- ii) aislamiento y/o purificación de dicho polipéptido o Nanocuerpo biparatópico de la invención obtenido de este modo.

En particular, un método de este tipo puede comprender los pasos de:

- i) cultivar y/o mantener un hospedador de la invención en condiciones que sean tales que dicho hospedador de la invención exprese y/o produzca al menos un polipéptido y/o Nanocuerpo biparatópico de la invención, y después, opcionalmente:
- ii) aislar y/o purificar el polipéptido o Nanocuerpo biparatópico de la invención obtenido de este modo.

En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención (o un fragmento adecuado de este). Un ácido nucleico de este tipo también se denominará en la presente «ácido nucleico de la invención» y puede, por ejemplo, encontrarse en la forma de un constructo genético, tal como se describe adicionalmente en la presente.

En 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 expuestas en las SEQ ID N.^{os} 25 a 43, 90 y las SEQ ID N.^{os} 213 a 219 que se refieren a los Nanocuerpos individuales específicos de las Tablas 9 y 32. Como alternativa, las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los constructos de Nanocuerpos multivalentes y biparatópicos de las SEQ ID N.^{os} 44 a 69. Además, las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención comprenden moléculas con las secuencias de ácido nucleico de las SEQ ID N.^{os} 192 a 211 que se refieren a los Nanocuerpos identificados en la Tabla 18.

Un ácido nucleico de la invención puede encontrarse en forma de ADN o ARN mono- o bicatenario, y se encuentra preferentemente en la forma de ADN bicatenario. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de la invención pueden ser ADN genómico, ADNc o ADN sintético (tal como ADN con un empleo de codones que se ha adaptado específicamente para la expresión en la célula hospedadora u organismo hospedador previsto).

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

El ácido nucleico de la invención se puede encontrar también en forma de vector, estar presente en él y/o ser parte de él, tal como, por ejemplo, un plásmido, cósmido o YAC, que nuevamente se puede encontrar en forma esencialmente aislada.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden preparar u obtener de una manera conocida de por sí, basándose en la información sobre las secuencias de aminoácidos para los polipéptidos de la invención proporcionadas en la presente y/o se pueden aislar a partir de una fuente natural adecuada. Para proporcionar análogos, las secuencias de nucleótidos que codifican dominios V_{HH} de origen natural se pueden someter, por ejemplo, a mutagénesis dirigida al sitio, para proporcionar un ácido nucleico de la invención que codifique dicho análogo. Además, como será evidente para el experto, con el fin de preparar un ácido nucleico de la invención, también se pueden conectar entre sí varias secuencias de nucleótidos, tal como al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención y, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican uno o más conectores de una forma adecuada.

Las técnicas para generar los ácidos nucleicos de la invención serán evidentes para el experto y pueden incluir, por ejemplo, sin carácter limitante, síntesis de ADN automatizada, mutagénesis dirigida al sitio; combinación de dos o más

secuencias de origen natural y/o sintéticas (o dos o más partes de estas), introducción de mutaciones que dan lugar a la expresión de un producto de expresión truncado, introducción de uno o más sitios de restricción (p. ej., para crear casetes y/o regiones que se pueden digerir y/o ligar fácilmente utilizando enzimas de restricción adecuadas), y/o la introducción de mutaciones por medio de una reacción de PCR utilizando uno o más cebadores «no coincidentes», utilizando, por ejemplo, una secuencia de una forma de CXCR2 de origen natural como molde. Estas y otras técnicas serán evidentes para el experto, y se hace referencia de nuevo a los manuales estándar tales como Sambrook *et al.* y Ausubel *et al.*, mencionados anteriormente, así como a los Ejemplos a continuación.

El ácido nucleico de la invención también se puede encontrar en forma de constructo genético, estar presente en él y/o ser parte de él. Dichos constructos genéticos generalmente comprenden al menos un ácido nucleico de la invención que está conectado opcionalmente con uno o más elementos de constructos genéticos conocidos de por sí tales como, por ejemplo, uno o más elementos reguladores adecuados (tal como uno o varios promotores, potenciadores, terminadores, etc., adecuados) y los elementos de constructos genéticos adicionales citados en la presente. Los constructos genéticos de este tipo que comprenden al menos un ácido nucleico de la invención también se denominarán en la presente como «constructos genéticos de la invención».

Los constructos genéticos de la invención pueden ser ADN o ARN, y son preferentemente ADN bicatenario. Los constructos genéticos de la invención también se pueden encontrar en una forma adecuada para la transformación de la célula hospedadora o el organismo hospedador previsto, en una forma adecuada para la integración en el ADN genómico de la célula hospedadora prevista o en una forma adecuada para la replicación independiente, el mantenimiento y/o la herencia en el organismo hospedador previsto. Por ejemplo, los constructos genéticos de la invención se pueden encontrar en forma de un vector tal como, por ejemplo, un plásmido, cósmido, YAC, un vector viral o transposón. En particular, el vector puede ser un vector de expresión, es decir, un vector que pueda propiciar la expresión *in vitro* y/o *in vivo* (p. ej., en una célula hospedadora, organismo hospedador y/o sistema de expresión adecuado).

En un aspecto preferido, pero no limitante, un constructo genético de la invención comprende:

- i) al menos un ácido nucleico de la invención, conectado operablemente 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 constructos genéticos conocidos de por sí;

en el cual las expresiones «conectado operablemente» y «ligado operablemente» tienen el significado proporcionado en las páginas 131-134 del documento WO 08/020079; y en el cual los «elementos reguladores», «promotor», «terminador» y «elementos adicionales» son tal como se describen en las páginas 131-134 del documento WO 08/020079; y en el cual los constructos genéticos pueden ser además tal como se describen en las páginas 131-134 del documento WO 08/020079.

Los ácidos nucleicos de la invención y/o los constructos genéticos de la invención se pueden utilizar para transformar una célula hospedadora u organismo hospedador, es decir, para la expresión y/o la producción del polipéptido o Nanocuerpo biparatópico de la invención. Los hospedadores o células hospedadoras adecuadas serán evidentes para el experto, y pueden ser, por ejemplo, cualquier célula o línea celular fúngica, procariota o eucariota adecuada, o cualquier organismo fúngico, procariota o eucariota adecuado, por ejemplo, los descritos en las páginas 134 y 135 del documento WO 08/020079; así como todos los demás hospedadores o células hospedadoras conocidas de por sí para la expresión y producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (que incluyen, sin carácter limitante, anticuerpos de dominio (único) y fragmentos ScFv), que serán evidentes para el experto. También se hace referencia a la técnica anterior general citada anteriormente en la presente, así como, por ejemplo, los documentos WO 94/29457; WO 96/34103; WO 99/42077; Frenken *et al.*, (1998), *supra*; Riechmann y Muyldermans, (1999), *supra*; van der Linden, (2000), *supra*; Thomassen *et al.*, (2002), *supra*; Joosten *et al.*, (2003), *supra*; Joosten *et al.*, (2005), *supra*; y las referencias adicionales citadas en la presente.

Los polipéptidos y Nanocuerpos biparatópicos de la invención también se pueden introducir y expresar en una o más células, tejidos u órganos de un organismo multicelular, por ejemplo, para fines profilácticos y/o terapéuticos (p. ej., como una terapia génica), tal como se describe adicionalmente en las páginas 135 y 136 del documento WO 08/020079 y en las referencias adicionales citadas en el documento WO 08/020079.

Para la expresión de los Nanocuerpos en una célula, estos se pueden expresar también en forma de los denominados «intracuerpos», tal como se describe, por ejemplo, en los documentos WO 94/02610, WO 95/22618 y US-A-7004940; WO 03/014960; en Cattaneo, A. & Biocca, S. (1997) *Intracellular Antibodies: Development and Applications*. Landes and Springer-Verlag; y en Kontermann, *Methods* 34, (2004), 163-170.

Los polipéptidos y Nanocuerpos biparatópicos de la invención se pueden producir también, por ejemplo, en la leche de mamíferos transgénicos, por ejemplo, en la leche de conejos, vacas, cabras u ovejas (remítase, por ejemplo, a los documentos US-A-6,741,957, US-A-6,304,489 y US-A-6,849,992 para consultar técnicas generales de introducción de transgenes en mamíferos), en plantas o partes de plantas que incluyen, sin carácter limitante, sus hojas, flores, frutos, semillas, raíces o tubérculos (por ejemplo, en tabaco, maíz, soja o alfalfa) o en, por ejemplo, pupas del gusano de seda *Bombix mori*.

Además, los Nanocuerpos y polipéptidos biparatópicos de la invención también se pueden expresar y/o producir en sistemas de expresión exentos de células, y algunos ejemplos adecuados de dichos sistemas serán evidentes para el experto. Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, incluyen la expresión en el sistema de germen de trigo, en lisatos de reticulocitos de conejo o en el sistema de Zubay en *E. coli*.

Tal como se ha mencionado anteriormente, una de las ventajas del uso de polipéptidos y Nanocuerpos biparatópicos es que los polipéptidos basados en ellos se pueden preparar mediante expresión en un sistema bacteriano adecuado, y los sistemas de expresión, vectores, células hospedadoras, elementos reguladores, etc., bacterianos adecuados serán evidentes para el experto, por ejemplo, a partir de las referencias citadas anteriormente. Sin embargo, cabe destacar que la invención en su sentido más amplio no se limita a la expresión en sistemas bacterianos.

Preferentemente, en la invención, se utiliza un sistema de expresión (*in vivo* o *in vitro*) tal como un sistema de expresión bacteriano que proporciona los polipéptidos de la invención en una forma que es adecuada para el uso farmacéutico, y dichos sistemas de expresión serán nuevamente evidentes para el experto. Como también será evidente para el experto, los polipéptidos de la invención adecuados para uso farmacéutico se pueden preparar utilizando técnicas para la síntesis peptídica.

Para la producción a escala industrial, los hospedadores heterólogos preferidos para la producción (industrial) de Nanocuerpos biparatópicos o compuestos terapéuticos proteicos que contienen Nanocuerpos incluyen cepas de *E. coli*, *Pichia pastoris*, *S. cerevisiae* que son adecuadas para la expresión/producción/fermentación a gran escala, y en particular, para la expresión/producción/fermentación farmacéutica (es decir, grado GMP) a gran escala. Algunos ejemplos adecuados de dichas cepas serán evidentes para el experto. Dichas cepas y sistemas de producción/expresión también son suministrados por compañías tales como Biovitrum (Uppsala, Suecia).

Como alternativa, se pueden utilizar líneas celulares de mamíferos, en particular 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, dichos sistemas de expresión/producción también son suministrados por algunas de las compañías mencionadas anteriormente.

La elección del sistema de expresión específico dependería en parte de la necesidad de determinadas modificaciones posteriores a la traducción, más específicamente, la glicosilación. La producción de una proteína recombinante que contiene Nanocuerpos para la que se desea o se requiere glicosilación exigiría el uso de hospedadores de expresión de mamíferos que tengan la capacidad de glicosilar la proteína expresada. A este respecto, será evidente para el experto que el patrón de glicosilación obtenido (es decir, el tipo, número y posición de los residuos incorporados) dependerá de la célula o línea celular que se utilice para la expresión. Preferentemente, se utiliza una célula o línea celular humana (es decir, que da lugar a una proteína que tiene esencialmente un patrón de glicosilación humano) o se utiliza otra línea celular de mamífero que pueda proporcionar un patrón de glicosilación que sea esencial y/o funcionalmente el mismo que la glicosilación humana o al menos imite la glicosilación humana. Por lo general, los hospedadores procariotas tales como *E. coli* no poseen la capacidad de glicosilar proteínas y el uso de eucariotas inferiores tales como levadura normalmente da lugar a un patrón de glicosilación que difiere de la glicosilación humana. No obstante, se debería sobreentender que todas las células hospedadoras y sistemas de expresión anteriores se pueden utilizar en la invención, en función del polipéptido o Nanocuerpo biparatópico que se desee obtener.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto de la invención, el polipéptido o Nanocuerpo biparatópico de la invención se glicosila. De acuerdo con otro aspecto no limitante de la invención, la secuencia de aminoácidos, Nanocuerpo o polipéptido de la invención no se glicosila.

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

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

De acuerdo con otro aspecto preferido, pero no limitante de la invención, el Nanocuerpo o polipéptido biparatópico 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 en particular, 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.

5 Tal como se describe adicionalmente en las páginas 138 y 139 del documento WO 08/020079, cuando se utiliza la expresión en una célula hospedadora para producir los polipéptidos y los Nanocuerpos biparatópicos de la invención, ya sean estos producidos intracelularmente (p. ej., en el citosol, en el periplasma o en cuerpos de inclusión) y posteriormente aislados de las células hospedadoras y opcionalmente más purificados; o pueden producirse extracelularmente (p. ej., en el medio en el que se cultivan las células hospedadoras) y posteriormente aislarse del medio de cultivo y, opcionalmente, purificarse más. Por tanto, de acuerdo con un aspecto no limitante de la invención,
10 el polipéptido o Nanocuerpo biparatópico de la invención es una secuencia de aminoácidos, Nanocuerpo o polipéptido que se ha producido intracelularmente y que se ha aislado de la célula hospedadora y, en particular, de una célula bacteriana o de un cuerpo de inclusión en una célula bacteriana. De acuerdo con otro aspecto no limitante de la invención, el polipéptido o Nanocuerpo biparatópico de la invención es un Nanocuerpo o polipéptido que se ha producido extracelularmente, y que se ha aislado del medio en el que se cultiva la célula hospedadora.

15 Algunos promotores preferidos, pero no limitantes, para su uso con estas células hospedadoras incluyen los mencionados en las páginas 139 y 140 del documento WO 08/020079.

Algunas secuencias secretoras preferidas, pero no limitantes, para su uso con estas células hospedadoras incluyen las mencionadas en la página 140 del documento WO 08/020079.

20 Las técnicas adecuadas para transformar un hospedador o célula hospedadora de la invención serán evidentes para el experto y pueden depender de la célula hospedadora/organismo hospedador previsto y el constructo genético a utilizar. Se hace referencia nuevamente a los manuales y solicitudes de patente mencionados anteriormente.

Después de la transformación, se puede llevar a cabo un paso para detectar y seleccionar aquellas células hospedadoras u organismos hospedadores que se hayan transformado con éxito con la secuencia de nucleótidos/constructo genético de la invención. Este puede ser, por ejemplo, un paso de selección basado en un
25 marcador seleccionable presente en el constructo genético de la invención o un paso que conlleva la detección del polipéptido de la invención, p. ej., utilizando anticuerpos específicos.

La célula hospedadora (que se puede encontrar en forma o una línea celular estable) u organismos hospedadores transformados (que se pueden encontrar en forma de una cepa o línea mutante estable) constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

30 Preferentemente, estas células hospedadoras u organismos hospedadores son tales que expresan o son capaces (al menos) de expresar (p. ej., en condiciones adecuadas), un polipéptido o Nanocuerpo biparatópico de la invención (y en caso de un organismo hospedador: en al menos una célula, parte, tejido u órgano de este). La invención también incluye generaciones adicionales, progenie y/o descendencia de la célula hospedadora u organismo hospedador de la invención, que se puede obtener, por ejemplo, por división celular o por reproducción sexual o asexual.

35 Para producir/obtener la expresión de las secuencias de aminoácidos de la invención, la célula hospedadora transformada u organismo hospedador transformado se pueden generalmente mantener, conservar y/o cultivar en condiciones tales que el polipéptido o Nanocuerpo biparatópico (deseado) de la invención se exprese/produzca. Las condiciones adecuadas serán evidentes para el experto y habitualmente dependerán de la célula hospedadora/organismo hospedador utilizado, así como de los elementos reguladores que controlan la expresión de
40 la secuencia de nucleótidos (relevante) de la invención. Nuevamente, se hace referencia a los manuales y solicitudes de patente mencionados anteriormente en los párrafos sobre los constructos genéticos de la invención.

Por lo general, las condiciones adecuadas pueden incluir el uso de un medio adecuado, la presencia de una fuente adecuada de alimento y/o nutrientes adecuados, el uso de una temperatura adecuada y, opcionalmente, la presencia de un compuesto o factor de inducción adecuado (p. ej., cuando las secuencias de nucleótidos de la invención se
45 encuentren bajo el control de un promotor inducible), todas las cuales pueden ser seleccionadas por el experto. Nuevamente, en tales condiciones, el polipéptido de la invención se puede expresar de manera constitutiva, de manera transitoria, o solamente cuando sea inducido de forma adecuada.

También será evidente para el experto que el polipéptido o Nanocuerpo biparatópico de la invención se puede generar (en primer lugar) en una forma inmadura (tal como se ha mencionado anteriormente), que se puede someter
50 posteriormente a modificación posterior a la traducción, en función de la célula hospedadora/organismo hospedador utilizado. Además, el polipéptido o Nanocuerpo biparatópico de la invención se puede glicosilar, nuevamente dependiendo de la célula hospedadora/organismo hospedador utilizado.

El polipéptido o Nanocuerpo biparatópico de la invención se puede aislar posteriormente de la célula

hospedadora/organismo hospedador y/o del medio en el que dicha célula hospedadora u organismo hospedador fue cultivado, utilizando técnicas de aislamiento y/o purificación de proteínas conocidas de por sí tales como técnicas de cromatografía (preparativa) y/o electroforesis, técnicas de precipitación diferencial, técnicas de afinidad (p. ej., utilizando una secuencia de aminoácidos escindible específica fusionada con la secuencia de aminoácidos, Nanocuerpo o polipéptido de la invención) y/o técnicas inmunológicas preparativas (es decir, utilizando anticuerpos contra la secuencia de aminoácidos a aislar).

Por lo general, para el uso farmacéutico, los polipéptidos de la invención se pueden formular como un preparado farmacéutico o composiciones que comprenden al menos un polipéptido de la invención y al menos un portador, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. A modo de ejemplos no limitantes, una formulación de este tipo se puede encontrar en una forma adecuada para la administración oral, para la administración parenteral (tal como mediante inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea o infusión intravenosa), para administración tópica, para administración por inhalación (por ejemplo, mediante un nebulizador, inhalador de dosis medida (MDI, por sus siglas en inglés) o inhalador de polvo seco (DPI, por sus siglas en inglés) o por la vía nasal), mediante un parche cutáneo, mediante un implante, mediante un supositorio, por vía sublingual, etc. Tales formas de administración adecuadas, que pueden ser sólidas, semisólidas o líquidas, dependiendo de la forma de administración, así como los métodos y portadores para su uso en la preparación de estas, serán evidentes para el experto y se describen adicionalmente en la presente.

Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos un polipéptido biparatópico de la invención, preferentemente al menos un dominio variable único de inmunoglobulina biparatópico y, más preferentemente, al menos un Nanocuerpo biparatópico de acuerdo con la invención, y al menos un portador, diluyente o excipiente adecuado (es decir, adecuado para el uso farmacéutico) y opcionalmente una o más sustancias activas adicionales.

Por lo general, los polipéptidos biparatópicos de la invención se pueden formular y administrar de cualquier forma adecuada conocida de por sí, para lo cual se hace referencia, por ejemplo, a la técnica anterior general citada anteriormente (y, en particular, a los documentos WO 04/041862, WO 04/041863, WO 04/041865, WO 04/041867 y WO 08/020079), así como a los manuales estándar tales como *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18.^a Ed., Mack Publishing Company, EE. UU. (1990), *Remington, the Science and Practice of Pharmacy*, 21.^a Edición, Lippincott Williams y Wilkins (2005); o *Handbook of Therapeutic Antibodies* (S. Dubel, Ed.), Wiley, Weinheim, 2007 remítase, por ejemplo, a las páginas 252-255).

Por ejemplo, los polipéptidos biparatópicos de la invención se pueden formular y administrar de una forma conocida de por sí para los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos convencionales (incluidos de ScFv y diacuerpos) y otras proteínas farmacéuticamente activas. Dichas formulaciones y métodos para prepararlas serán evidentes para el experto y, por ejemplo, incluyen preparados adecuados para la administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intraluminal, intraarterial o intratecal) o para administración tópica (es decir, transdérmica o intradérmica).

Los preparados para la administración parenteral pueden ser, por ejemplo, soluciones, suspensiones, dispersiones o emulsiones estériles que son adecuadas para infusión o inyección. Los portadores o diluyentes adecuados para dichos preparados incluyen, por ejemplo, sin limitación, los mencionados en la página 143 del documento WO 08/020079. Normalmente, se preferirán soluciones o suspensiones acuosas.

Los polipéptidos biparatópicos de la invención que incluyen dominios variables únicos de inmunoglobulina y Nanocuerpos biparatópicos también se pueden administrar utilizando métodos de suministro con terapia génica. Remítase, p. ej., a la Patente de EE. UU. N.º 5 399 346. Al utilizar un método de suministro con terapia génica, las células primarias transfectadas con el gen que codifica un polipéptido o biparatópico de la invención se pueden transfectar adicionalmente con promotores histoespecíficos para que se dirijan a órganos, tejido, injertos, tumores o células específicos y se pueden transfectar adicionalmente con secuencias de estabilización y señalización para una expresión localizada a nivel subcelular.

Por tanto, los Nanocuerpos, dominios variables únicos de inmunoglobulina, polipéptidos y biparatópicos de la invención se pueden administrar de forma sistémica, p. ej., oralmente, combinados con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. Estos se pueden envolver en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, se pueden comprimir para formar comprimidos o se pueden incorporar directamente con el alimento de la dieta del paciente. Para la administración terapéutica oral, los polipéptidos biparatópicos de la invención pueden combinarse con uno o más excipientes y utilizarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, pastillas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Dichas composiciones y preparados deberían contener al menos un 0,1% del polipéptido, dominio variable único de inmunoglobulina o Nanocuerpo biparatópico de la invención. Su porcentaje en las composiciones y preparados se puede variar, naturalmente, y se puede encontrar, convenientemente, entre aproximadamente un 2 y aproximadamente un 60% del peso de una forma farmacéutica unitaria determinada. El polipéptido biparatópico de la invención en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal

que se obtendrá un nivel de dosificación eficaz.

Los comprimidos, pastillas, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener aglutinantes, excipientes, agentes desintegrantes, lubricantes y agentes edulcorantes o saborizantes, por ejemplo, los mencionados en las páginas 143-144 del documento WO 08/020079. Cuando la forma farmacéutica unitaria es una cápsula, esta puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Varios materiales diferentes pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la forma farmacéutica unitaria sólida. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas se pueden recubrir con gelatina, cera, laca o azúcar, y similares. Un jarabe o elixir puede contener los polipéptidos y Nanocuerpos biparatópicos de la invención, sacarosa o fructosa como agente edulcorante, metil- y propilparabenos como conservantes, un colorante y saborizante tal como aroma de cereza o naranja. Naturalmente, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma farmacéutica unitaria debería ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, los Nanocuerpos, dominios variables únicos de inmunoglobulina y polipéptidos biparatópicos de la invención se pueden incorporar en preparados y dispositivos de liberación sostenida.

Los preparados y formulaciones para administración oral también se pueden proveer de un recubrimiento entérico que permitirá que los constructos de la invención resistan el entorno gástrico y se introduzcan en el intestino. De forma más general, los preparados y formulaciones para la administración oral se pueden formular de forma adecuada para el suministro en cualquier parte deseada del tracto gastrointestinal. Además, se pueden utilizar supositorios adecuados para el suministro en el tracto gastrointestinal.

Los Nanocuerpos, dominios variables únicos de inmunoglobulina y polipéptidos biparatópicos de la invención también se pueden administrar por vía intravenosa o intraperitoneal mediante infusión o inyección, tal como se describe adicionalmente en las páginas 144 y 145 del documento WO 08/020079.

Para la administración tópica, los Nanocuerpos, dominios variables únicos de inmunoglobulina y polipéptidos biparatópicos de la invención se pueden aplicar en forma pura, es decir, cuando son líquidos. Sin embargo, será generalmente deseable administrarlos a la piel como composiciones o formulaciones, combinados con un portador dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido, tal como se describe adicionalmente en la página 145 del documento WO 08/020079.

Por lo general, la concentración de los Nanocuerpos, dominios variables únicos de inmunoglobulina y polipéptidos biparatópicos de la invención en una composición líquida, tal como una loción, será de aproximadamente un 0,1-25% en peso, preferentemente de aproximadamente un 0,5-10% en peso. La concentración en una composición semisólida o sólida tal como un gel o un polvo será de aproximadamente un 0,1-5% en peso, preferentemente de aproximadamente un 0,5-2,5% en peso.

La cantidad de Nanocuerpos, dominios variables únicos de inmunoglobulina y polipéptidos biparatópicos de la invención requerida para su uso en el tratamiento variará no solamente con el polipéptido o Nanocuerpo biparatópico particular seleccionado, sino también con la vía de administración, la naturaleza de la afección que se esté tratando y la edad y estado del paciente y será, en última instancia, a la discreción del profesional sanitario o facultativo responsable. Además, la dosificación de los polipéptidos y Nanocuerpos biparatópicos de la invención varía dependiendo de la célula, tumor, tejido, injerto u órgano diana.

La dosis deseada se puede presentar convenientemente en una dosis única o como dosis divididas administradas en intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis por día. La subdosis en sí se puede dividir adicionalmente, p. ej., en un número de administraciones diferentes ligeramente separadas tales como inhalaciones múltiples desde un insuflador o mediante aplicación de una pluralidad de gotas en el ojo.

Un régimen de administración podría incluir un tratamiento diario a largo plazo. Se pretende que la expresión «largo plazo» se refiera a al menos dos semanas y, preferentemente, varias semanas, meses o años de duración. Algunas modificaciones necesarias en este intervalo de dosificación pueden ser determinadas por un experto en la técnica utilizando solamente experimentación rutinaria teniendo en cuenta el contenido de la presente. Remítase a *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. La dosificación también puede ser ajustada por el facultativo individual en caso de cualquier complicación.

En otro de sus aspectos, la invención se refiere a un método para tratar enfermedades o afecciones que conllevan un funcionamiento aberrante de la transducción de señales de CXCR2 administrando una cantidad eficaz de un polipéptido o composición farmacéutica de acuerdo con la invención y, preferentemente, dominios variables únicos de inmunoglobulina o Nanocuerpos biparatópicos o una composición que los contenga de acuerdo con la invención. Tal como se ha discutido en la presente, la transducción de señales de CXCR2 media una respuesta inflamatoria en los pulmones en pacientes que padecen la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) que provoca la destrucción de la parénquima pulmonar. La migración de leucocitos, que se observan en cantidades elevadas en los pulmones de pacientes que padecen EPOC es mediada por el CXCR2 en la superficie de dichas células y el cual se une a varios

ligandos que incluyen IL-8, Gro- α , β , γ , EMA 78 y GCP-2. Los valores elevados de neutrófilos en los pulmones se correlacionan con la gravedad de la enfermedad. Además, la concentración de Gro- α es notablemente elevada en el esputo inducido y en el fluido de lavado bronquial (LBA) de pacientes con EPOC. Por consiguiente, se espera que el antagonismo de CXCR2 prevenga, trate o alivie los dolorosos síntomas de esta enfermedad.

- 5 Por consiguiente, la invención se refiere a métodos para prevenir o tratar la EPOC o exacerbaciones de EPOC que comprende administrar un polipéptido biparatópico tal como dominios variables únicos de inmunoglobulina o Nanocuerpos biparatópicos de la invención y, en particular, composiciones farmacéuticas de estos. La invención también se refiere al uso de dicho polipéptido biparatópico, que incluye Nanocuerpos biparatópicos y composiciones que los contienen para tratar la EPOC y exacerbaciones de EPOC.
- 10 Será fácilmente evidente para el lector experto que los polipéptidos biparatópicos de la invención, en particular, los dominios variables únicos de inmunoglobulina o Nanocuerpos biparatópicos y composiciones de estos, son también útiles en el tratamiento de otras enfermedades en las que está implicada una función aberrante de la transducción de señales de CXCR2, por ejemplo, otras afecciones del tracto respiratorio tales como fibrosis quística, asma grave, exacerbaciones de asma, asma alérgica, lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda, fibrosis pulmonar idiopática, remodelación de las vías aéreas, síndrome de bronquiolitis obliterante o displasia broncopulmonar.
- 15

- Algunas enfermedades y afecciones adicionales que se pueden prevenir o tratar con los polipéptidos biparatópicos de la invención, por ejemplo, los dominios variables únicos de inmunoglobulina o Nanocuerpos biparatópicos y composiciones farmacéuticas de estos son aterosclerosis, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria del intestino (de Chron), angiogénesis y enfermedades caracterizadas por el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos que incluyen degeneración macular, retinopatía diabética y neuropatía diabética, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad degenerativa macular asociada a la edad, enfermedad de Behcet ocular, uveítis, hipertensión arterial pulmonar (HAP) que incluye la HAP idiopática, HAP familiar y HAP asociada, enfermedades inflamatorias crónicas, artritis reumatoide, osteoartritis, carcinoma no microcítico, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer esofágico, cáncer ovárico, cáncer de mama, tumores sólidos y metástasis, melanoma, carcinoma hepatocelular o lesión por isquemia-perfusión.
- 20

- 25 Algunas enfermedades y afecciones adicionales que se pueden prevenir o tratar con los polipéptidos biparatópicos de la invención, por ejemplo, los dominios variables únicos de inmunoglobulina o Nanocuerpos biparatópicos y composiciones farmacéuticas de estos son la crisis de vasooclusión inducida por transfusión hemolítica en la enfermedad de células falciformes, lesión por isquemia/reperfusión, infarto de miocardio/accidente cerebrovascular agudo, lesión craneal cerrada, inflamación postraumática y diabetes insulinoresistente.

- 30 Para los métodos anteriores, los Nanocuerpos, dominios variables únicos de inmunoglobulina y/o polipéptidos biparatópicos de la invención y/o las composiciones que los comprenden se pueden administrar de cualquier manera adecuada, en función de la composición o formulación farmacéutica específica a utilizar. Por tanto, los polipéptidos y/o Nanocuerpos biparatópicos de la invención y/o las composiciones que los comprenden se pueden administrar, por ejemplo, por vía oral, intraperitoneal (p. ej., por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular o mediante cualquier otra
- 35 vía de administración que eluda el tracto gastrointestinal), intranasal, transdérmica, tópica, por medio de un supositorio, por inhalación, nuevamente en función de la composición o formulación farmacéutica específica a utilizar. En general, para la EPOC, la inhalación no es una vía preferida. El profesional sanitario podrá seleccionar una vía de administración adecuada y una composición o formulación farmacéutica adecuada para que se utilice en dicha administración, en función de las necesidades de un paciente individual.

- 40 Los Nanocuerpos, dominios variables únicos de inmunoglobulina y/o polipéptidos biparatópicos de la invención y/o las composiciones que los comprenden se administran de acuerdo con un régimen de tratamiento que es adecuado para prevenir y/o tratar la enfermedad o trastorno a prevenir o tratar. El profesional sanitario generalmente podrá determinar un régimen de tratamiento adecuado, en función de factores tales como la enfermedad o trastorno a prevenir o tratar, la gravedad de la enfermedad a tratar y/o la gravedad de sus síntomas, los Nanocuerpos, dominios variables únicos
- 45 de inmunoglobulina o polipéptido biparatópicos específicos de la invención a utilizar, la vía de administración específica y la composición o formulación farmacéutica a utilizar, la edad, el género, peso, dieta, estado general del paciente y factores similares muy conocidos para el profesional sanitario.

- Por lo general, para la prevención y/o tratamiento de las enfermedades y trastornos mencionados en la presente, en particular la EPOC, la cantidad a administrar dependerá de la potencia del Nanocuerpo, dominios variables únicos de inmunoglobulina o polipéptido biparatópicos específicos de la invención a utilizar, la vía de administración específica y la composición o formulación farmacéutica utilizada. Por lo general, se administrará en una cantidad de entre 1 gramo y 0.01 microgramos por kg de peso corporal por día, preferentemente entre 0.1 gramos y 0.1 microgramos por kg de peso corporal por día tal como aproximadamente 1, 10, 100 o 1000 microgramos por kg de peso corporal por día, ya sea de forma continua (p. ej., por infusión), como una única dosis diaria o como múltiples
- 50 dosis divididas durante el día. El profesional sanitario generalmente podrá determinar una dosis diaria adecuada, en función de los factores mencionados en la presente. También será evidente que en casos específicos, el profesional sanitario puede elegir desviarse de estas cantidades, por ejemplo, basándose en los factores citados anteriormente y en su juicio experto.
- 55

- 5 Los Nanocuerpos, dominios variables únicos de inmunoglobulina, y polipéptidos biparatópicos de la invención se pueden utilizar también combinados con uno o más compuestos o principios farmacéuticamente activos adicionales, es decir, como un régimen de tratamiento combinado, que puede dar lugar o no a un efecto sinérgico. Nuevamente, el profesional sanitario podrá seleccionar dichos 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 Nanocuerpos biparatópicos de la invención con tratamientos convencionales para la EPOC tales como broncodilatadores β -adrenérgicos de acción corta y prolongada, anticolinérgicos inhalados (antagonistas muscarínicos) y corticosteroides inhalados.

- 10 La eficacia del régimen de tratamiento utilizado de acuerdo con la invención se puede determinar y/o seguir de cualquier manera conocida de por sí para la enfermedad o trastorno implicado, como será evidente para el profesional sanitario. El profesional sanitario también podrá, cuando corresponda, y caso por caso, cambiar o modificar un régimen de tratamiento particular, para lograr el efecto terapéutico deseado, para evitar, limitar o reducir efectos secundarios indeseados y/o para lograr un balance apropiado entre, por una parte, lograr el efecto terapéutico deseado y, por otra parte, evitar, limitar o reducir efectos secundarios indeseados.

- 15 Por lo general, el régimen de tratamiento se seguirá hasta que se logre el efecto terapéutico deseado y/o mientras se haya de mantener el efecto terapéutico deseado. Nuevamente, esto puede ser determinado por el profesional sanitario.

El sujeto a tratar puede ser cualquier animal de sangre caliente, pero es en particular un mamífero, y más en particular, un ser humano. Como será evidente para el experto, el sujeto a tratar será en particular una persona que padece las enfermedades y trastornos mencionados en la presente o se encuentra en riesgo de padecerlos.

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

Información de depósito

- 25 Seis depósitos de ADN plasmídico con insertos que codificaban los polipéptidos de los nanocuerpos con secuencia optimizada mostrados en la Tabla 32 fueron realizados el 15 de junio de 2010 en DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse, 7B, D-38124, Braunschweig, Alemania por Novartis Pharma AG, Suiza. Los depósitos se realizaron de acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes del 28 de abril de 1997 y tienen los siguientes Números de acceso:

Constructo de origen natural	Constructo optimizado	Número de DSM
2B2	C100CXCR20059	DSM 23723
97A9	C100CXCR20061	DSM 23724
163E3	C100CXCR20076	DSM 23725
127D1	C100CXCR20079	DSM 23726
163D2	C100CXCR20086	DSM 23727
54B12	C100CXCR20104	DSM 23728

1. Clonación de CXCR2 cino y humano

TABLA 1

CXCR2 humano SEQ ID NO.1	MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSTLPPFLDDAAPCEPESLEINKYFVVIYALV FLLSLLGNSLVMLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPWAASKVNGWIFGTFL CKVVSLLEKVNIFYSGILLACISVDYLAIVHATRTLTQKRYLVKFICLSIWGLSLLLALP VLLFRRTVYSSNVSPACYEDMGNNANWRMLLRILPQSFGFIVPLLMFCYGFTRLRT LFKAHMGQKHRAMRVIFAVVLIFLLCWLPYNLVLLADTLMRTQVIQETCERRNHIDRA LDATEILGILHSCNPLIYAFIGQKFRHGLLKILAIHGLISKDSLPKDSRPSFVGSSSGHT STTL
CXCR2 humano Δ 1-17 SEQ ID NO. 2	MEDLSNYSYSTLPPFLDDAAPCEPESLEINKYFVVIYALVFLSLLGNSLVMLVILYS RVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPWAASKVNGWIFGTFLCKVVSLLEKVNIFYSGIL LLACISVDYLAIVHATRTLTQKRYLVKFICLSIWGLSLLLALPVLLFRRTVYSSNVSPA CYEDMGNNANWRMLLRILPQSFGFIVPLLMFCYGFTRLRTLFKAHMGQKHRAMRV IFAVVLIFLLCWLPYNLVLLADTLMRTQVIQETCERRNHIDRALDATEILGILHSCNPLI YAFIGQKFRHGLLKILAIHGLISKDSLPKDSRPSFVGSSSGHTSTTL
CXCR2 de cinomolgo SEQ ID NO. 3	MQSFNFEDFWENEDFSNYSYSSDLPPSLPDVAPCRPESLEINKYFVVIYALVFLSLL GNSLVMLVILHSRVGRSITDVYLLNLAMADLLFALTLPWAAAKVNGWIFGTFLCKVVS LLKEVNIFYSGILLACISVDYLAIVHATRTLTQKRYLVKFVCLSIWSLSLLLALPVLLFR RTVYLTYSVPCYEDMGNNATAKWRMVLRLPQTFGFILPLLMFCYGFTRLRTLFKAHM GQKHRAMRVIFAVVLIFLLCWLPYHLVLLADTLMRTRLINETCQRRNNIDQALDATEIL GILHSCNPLIYAFIGQKFRHGLLKILATHGLISKDSLPKDSRPSFVGSSSGHTSTTL

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

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

TABLA 2

Constructos		
Receptor	Vector	Construcción
CXCR2 humano (etiqueta HA N terminal 3x)	pcDNA4/TO	Se subclona una secuencia de ADN que codifica tres etiquetas HA seguida de la secuencia de CXCR2 hu, enmarcada por un sitio de enzima de restricción HindIII y XhoI en el extremo 5' y 3', respectivamente, en pcDNA4/TO
CXCR2 quimérico con CCR9 N terminal humano (etiqueta HA N terminal 3x)	pcDNA4/TO	Se subclona una secuencia de ADN que codifica tres etiquetas HA seguida de los primeros 39 aminoácidos para CCR9 hu, un sitio de proteasa TEV y la secuencia de CXCR2 hu menos los 43 aminoácidos N terminales, enmarcada por un sitio de enzima de restricción HindIII y XhoI en el extremo 5' y 3', respectivamente, en pcDNA4/TO
CXCR2 humano Δ 1-17 (etiqueta HA N terminal 3x)	pcDNA4/TO	Se subclona una secuencia de ADN que codifica tres etiquetas HA seguida de la secuencia de CXCR2 hu que carece de los 17 aminoácidos N terminales, enmarcada por un sitio de enzima de restricción HindIII y XhoI en el extremo 5' y 3', respectivamente, en pcDNA4/TO

(continuación)

Constructos		
Receptor	Vector	Construcción
CXCR2 humano	pXoon	Se amplificó ADNc (GENBANK:L19593) de CXCR2 humano (hCXCR2) por PCR utilizando un cebador 5' que contenía un sitio de escisión de <i>EcoRI</i> y un cebador 3' que contenía un sitio <i>NotI</i> . El producto de PCR se ligó en un vector plasmídico pXOON
CXCR2 de cinomolgo	pcDNA3.1	El ADNc de CXCR2 cinomolgo se amplificó a partir de una colección de ADNc cinomolgo de bazo/timo. Se añadieron sitios de enzimas de restricción <i>NotI</i> y <i>XhoI</i> mediante PCR y el fragmento resultante se clonó en pcDNA3.1
CXCR2 humano	pVAX1	PCR (<i>NheI</i> - <i>NotI</i>) en pXoon_hCXCR2
CXCR2 de cinomolgo	pVAX1	<i>NheI</i> - <i>XhoI</i> de pcDNA3.1_cCXCR2
CXCR2 humano Δ1-17	pVAX1	PCR (<i>HindIII</i> - <i>XhoI</i>) en pcDNA3.1_3xHA-Δ1-17-hCXCR2
CXCR2 humano Δ1-17 (etiqueta HA N terminal 3x)	pcDNA3.1	<i>HindIII</i> - <i>XhoI</i> de pCR4Blunt-TOPO_3xHA-Δ1-17-hCXCR2
CXCR2 humano	pcDNA3.1	<i>NheI</i> - <i>XhoI</i> de pVAX1_hCXCR2

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

TABLA 3

Líneas celulares			
Hospedador	Transformación	Receptor	Vector
CHO	Estable	CXCR2 humano Δ1-17 (etiqueta HA N terminal 3x)	pcDNA3.1
HEK293T	Transitoria	CXCR2 de cinomolgo	pcDNA3.1
Info de Caki a añadir			
/	Inmunización del ADN	CXCR2 humano	pVAX1
/	Inmunización del ADN	CXCR2 de cinomolgo	pVAX1
/	Inmunización del ADN	CXCR2 humano Δ1-17	pVAX1
RBL	Estable	ADNc de CXCR2 humano	pSFFV-Neo
RBL -2H3	Estable	ADNc de CXCR2 cinomolgo	pcDNA3.1
CHO-Trex	Estable	(HA)3-huCXCR2	pcDNA4/TO
CHO-Trex	Estable	(HA)3-huCCR9-huCXCR2	pcDNA4/TO

(continuación)

Líneas celulares			
Hospedador	Transformación	Receptor	Vector
CHO-Trex	Estable	(HA)3-huCXCR2 ΔN1-17	pcDNA4/TO
L2071	Estable	CXCR1 humano	pSFFV neo
CEM	Endógeno	CXCR4	-

CXCR2 humano Δ1-17 (etiqueta HA N terminal 3x) en CHO-K1

Se transfectaron células CHO-K1 con pcDNA3.1_3xHA-Δ1-17-hCXCR2 plasmídico utilizando el sistema de electroporación Amaxa (Programa U 23 en solución T). El lote de células transfectadas se mantuvo bajo presión de selección (1000 µg/mL G418) desde el día dos después de la transfección. Ocho días más tarde, se identificó una población positiva para CXCR2 humano con el uso de GRO-α humano marcado con FMAT Blue. El marcaje de Gro-α humano con FMAT Blue (Biosource, PHC1063) se llevó a cabo utilizando el Kit de colorante reactivo monofuncional FMAT Blue de acuerdo con las directrices del fabricante (Applied Biosystems, 4328408). Las células individuales se clasificaron en placas de cultivo celular de 96 pocillos utilizando un FACSaria (BD Biosciences). Los clones en crecimiento se evaluaron en cuanto a la expresión de CXCR2 humano Δ1-17 en un dispositivo FACSarray (BD Biosciences) con el uso de GRO-α humano marcado con FMAT Blue. Se seleccionaron los clones de CHO-K1 con la mayor expresión (valor MCF de 9000).

CXCR2 de cinomolgo en HEK293T

Se transfectaron células HEK293T con pcDNA3.1_cCXCR2 plasmídico utilizando el Reactivo de transfección FuGene HD (Roche). Dos días después de la transfección, las células se evaluaron en cuanto a la expresión de cCXCR2 en un dispositivo FACSarray (BD Biosciences) con el uso de GRO-α marcado con FMAT Blue 50nM. Las células con una buena expresión (valor MCF en torno a 12000) se utilizaron ulteriormente.

CXCR2 de cinomolgo en RBL-2H3

Las células de leucemia basófila de rata (RBL-2H3), cultivadas a 37 °C/5% de CO₂ y subcultivadas de forma rutinaria en medio MEM de Eagle (Invitrogen) suplementado con 1X aminoácidos no esenciales, un 0.15% de bicarbonato sódico, piruvato sódico 1mM y un 15% de suero fetal bovino (Invitrogen), se sometieron a nucleofección por electroporación (Amaxa Biosystems) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células transfectadas se incubaron a 37 °C/5% de CO₂, y 24 horas después de la transfección se inició la selección con antibióticos añadiendo Geneticin hasta una concentración final de 1 mg/mL. Las células transfectadas se cultivaron y subcultivaron durante 3-5 días en medio de selección antes de someterlas a clasificación de células individuales mediante dilución en serie en placas de 96 pocillos. Después de aproximadamente dos semanas, las colonias que crecían de forma activa se expandieron y se analizaron posteriormente para determinar la expresión del transcrito cynoCXCR2. Los clones positivos se expandieron adicionalmente entonces para su análisis.

Híbrido de (HA)3-huCXCR2 y (HA)3huCCR9-CXCR2 en CHO-Trex

Las células de ovario de hámster chino T-Rex (T-Rex™-CHO, Invitrogen, #R718-07) se mantuvieron a 37 °C como cultivos monocapa en medio de Ham F12 que contenía L-Glutamina 2 mM suplementado con un 10% de suero fetal bovino exento de tetraciclina (FBS) (Biosera), 1% de Penicilina/Estreptomicina y 10 µg/mL de Blastomicina. Esta línea celular con expresión regulada por tetraciclina (T-Rex™) expresa de manera estable el represor de tetraciclina (TetR). A continuación, se produjeron líneas celulares estables que expresaban ambos constructos de CXCR2 utilizando un procedimiento de nucleofección (Cell line Nucleofector Kit T, Amaxa Biosystem, programa U-23). Las células transfectadas se incubaron a 37 °C/5% de CO₂, y se trataron con una concentración de 300 µg/mL de Zeocin 48 horas después de la transfección. Las células se cultivaron durante un par de semanas en presencia de Zeocin para permitir la selección de transformantes positivos, tras lo cual se llevó a cabo una clasificación de células individuales utilizando el clasificador Mo-Flo FACS. Dos semanas más tarde, las colonias que crecían de forma activa se expandieron a la vez que se mantenían en su medio regular con una concentración de Zeocin de 300 µg/mL.

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

TABLA 4

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

4. Péptidos

Los péptidos que representaban diferentes segmentos de extremo N terminal y bucle extracelular (EL) de CXCR2 humano y cinomolgo se encargaron de Bachem (Tabla 5). En los péptidos designados como «cíclicos», el primer y último aminoácido se reemplazaron por un residuo de cisteína y los residuos de cisteína internos presentes de forma natural de la secuencia de origen natural se reemplazaron por un residuo de leucina. Estos péptidos se ciclaron a través de los residuos de cisteína flanqueantes.

TABLA 5

Nombre	Secuencia	Modificación
1 a 14 de cinomolgo	MQSFNFEDFWENED SEQ ID NO. 4	conjugada a biotina a través del extremo C terminal
EL3 de cinomolgo cíclico	CTLMRTRLINETLQRRNC SEQ ID NO. 5	conjugada a biotina o KLH a través del extremo N terminal
EL2 de cinomolgo cíclico	CRRTVYLTYSPLVYEDMGNNALWC SEQ ID NO.6	conjugada a biotina o KLH a través del extremo N terminal
1 a 19 humano	MEDFNMESDSFEDFWKGED SEQ ID NO. 7	conjugada a biotina a través del extremo C terminal
18 a 48 humano	EDLSNYSYSTLPFLDAAPCEPESLEINK SEQ ID NO. 8	conjugada a biotina a través del extremo C terminal
EL2 humano	FRRTVYSSNVSPACYEDMGNNANWR SEQ ID NO.9	conjugada a biotina o KLH a través del extremo N terminal
EL2 humano cíclico	CRRTVYSSNVSPALYEDMGNNANWC SEQ ID NO. 10	conjugada a biotina o KLH a través del extremo N terminal
EL3 humano	DTLMRTQVIQETCERRNH SEQ ID NO. 11	conjugada a biotina o KLH a través del extremo N terminal
EL3 humano cíclico	CTLMRTQVIQETLERRNC SEQ ID NO.12	conjugada a biotina o KLH a través del extremo N terminal

5. Inmunizaciones

Se inmunizaron tres llamas de siete a nueve veces con células de mamíferos que expresaban CXCR2 humano y una llama se inmunizó seis veces con células de mamífero que expresaban CXCR2 de cinomolgo. Este régimen se siguió de cuatro administraciones de cócteles de conjugado de péptido-hemocianina de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés) mezclado en adyuvante de Freund (in)completo, representando los péptidos los bucles extracelulares números 2 y 3 de CXCR2 tanto humano como cinomolgo (remítase a la Tabla 5). Se inmunizaron otras ocho llamas de cuatro a cinco veces con ADN que codificaba CXCR2 completo o CXCR2 Δ 1-17 humano expresado a partir de pVAX1 seguido de una administración de células de mamíferos que expresaban CXCR2 completo humano. Se

inmunizaron tres llamas adicionales cuatro veces con ADN que codificaba CXCR2 de cinomolgo expresado a partir de pVAX1 seguido de una administración de células de mamíferos que expresaban CXCR2 de cinomolgo. Se tomaron muestras de nódulos linfáticos y de sangre inmunitarias cuatro y ocho días después de la administración de cada uno de los antígenos.

5 6. Construcciones de las colecciones

Se produjeron muestras de ADNc a partir de preparados de ARN total de las muestras de nódulos linfáticos y sangre inmunitaria. Se amplificaron secuencias de nucleótidos que codificaban Nanocuerpos a partir de las muestras de ADNc de todas las llamas inmunizadas con CXCR2 humano o cinomolgo en una reacción de RT-PCR en un paso utilizando los cebadores ABL051, ABL052 y ABL003. Las secuencias de cebadores se muestran en la Tabla 6. Los amplicones de 700 pb amplificados a partir del ADNc de IgG2 e IgG3 en la muestra se aislaron a partir del gel y posteriormente se utilizaron como molde en una reacción de PCR anidada utilizando el cebador ABL050 que contenía el sitio de enzima de restricción *Sfi*I y el cebador ABL003. Los productos de PCR se digirieron posteriormente con *Sfi*I y *Bst*EII (que se encuentran presentes de forma natural en la FR4 de los genes de V_{HH}) y se ligaron en los sitios de restricción correspondientes del vector fagémido pAX50 para obtener una colección tras la electroporación en *Escherichia coli* TG-1. El pAX50 es un vector de expresión procedente de pUC119 que contenía el promotor LacZ, una secuencia codificadora de la proteína pIII de colifago, un gen de resistencia a ampicilina o carbenicilina, un sitio de multiclonación y la secuencia líder gen3. En fase con la secuencia codificante Nanobody®, el vector codificaba una etiqueta c-myc C terminal y una etiqueta (His)6. El vector fagémido permite la producción de partículas de fago, que expresan los Nanocuerpos individuales como una proteína de fusión con el producto *genell*

Tabla 6 - Secuencias de cebadores

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

7. Selecciones

Las colecciones de Nanocuerpos de pAX50 mencionadas anteriormente, expresadas en la superficie de bacteriofagos, se seleccionaron utilizando péptidos, extractos de membranas y células enteras que presentaban epítomos de CXCR2.

Las selecciones utilizando péptidos consistieron en incubar las colecciones de fagos en concentraciones 0-1000 nM de péptidos biotinilados (remítase a la Tabla 5) capturados en placas de microtitulación Maxisorp (Nunc, 430341) recubiertas con neutravidina (Pierce, 31000). Como alternativa, las colecciones de fagos se incubaron en solución con péptido biotinilado 10 nM y después se capturaron los complejos de péptido-fago en Dynabeads recubiertas con estreptavidina (Invitrogen, 112-06D). El bloqueo se llevó a cabo utilizando PBS suplementado con un 1% de caseína. Los fagos preparados a partir de las colecciones se añadieron e incubaron durante 1 hora (en PBS suplementado con un 0.1% de caseína y un 0.1% de tween 20). Los fagos no unidos se eliminaron mediante lavado (con PBS suplementado con un 0.05% de tween 20), los fagos unidos se eluyeron por adición de tripsina (1 mg/ml en PBS) durante 15 min. Las segundas rondas de selección se llevaron a cabo esencialmente como se ha descrito anteriormente.

Las selecciones utilizando extractos de membranas se llevaron a cabo recubriendo inmunotubos (Nunc, 444474) con una concentración de 50 ug/mL (proteína total) de extractos de membranas preparados a partir de células que expresaban CXCR2 humano (Perkin Elmer, ES-145-M400UA y 6110524400UA). Como control negativo, se recubrieron en paralelo extractos de membranas preparados a partir de células CHO que expresaban FPR1 humana (Perkin Elmer, 6110527400UA). El bloqueo se llevó a cabo utilizando PBS suplementado con un 4% de leche desnatada en polvo Marvel. Los fagos se incubaron durante 2 horas (en PBS suplementado con un 1% de Marvel). Los fagos no unidos se eliminaron mediante lavado con PBS, los fagos unidos se eluyeron mediante adición de tripsina (1mg/mL en PBS) durante 15 min. Las segundas rondas de selección se llevaron a cabo esencialmente tal como se ha descrito anteriormente. En algunos casos, los fagos que se unían a epítomos secundarios celulares irrelevantes se consumieron específicamente preabsorbiendo el fago en sucesivos tubos o pocillos recubiertos con extractos de membranas de control. A continuación, se llevó a cabo la incubación en los extractos de membranas con CXCR2 humano recubiertos en presencia de extracto de membrana de control en solución. En otros experimentos, a una o dos rondas de selección en péptidos siguió una ronda de selección en extractos de membranas o viceversa.

En otro conjunto de experimentos, se incubaron de 1 a 5 millones de células de mamíferos que expresaban CXCR2 humano o cinomolgo con las colecciones de fagos en PBS suplementado con un 10% de FBS y un 1% de leche desnatada en polvo Marvel. Las líneas celulares no transformadas se utilizaron como controles negativos. Los fagos no unidos se eliminaron mediante lavado con PBS, los fagos unidos se eluyeron mediante adición de tripsina (1mg/mL en PBS) durante 15 min. Se llevaron a cabo segundas rondas esencialmente tal como se ha descrito anteriormente, pero en un contexto de línea celular diferente a la primera ronda.

En otros experimentos, los fagos se incubaron con extractos de membranas o células de mamíferos que expresaban CXCR2 en presencia de una concentración 1μM de péptidos (remítase a la Tabla 5) en solución, para consumir los fagos que expresaban Nanocuerpos que se unían a regiones representadas por estos péptidos.

8. Preparación de extractos periplásmicos

Se permitió que los fagos eluidos infectaran células TG-1 que crecían exponencialmente, las cuales posteriormente se colocaron en placas de agar LB que contenían carbenicilina. Los clones resistentes a carbenicilina se analizaron para determinar la presencia del inserto y las secuencias de los clones positivos se verificaron. Los clones de interés se cultivaron en medio TB suplementado con carbenicilina y se indujeron mediante la adición de IPTG para su expresión. Se permitió que la expresión prosiguiese durante 4 horas a 37 °C y posteriormente se centrifugaron las células. Se disolvieron pellets de células congelados durante la noche de cultivos de expresión de *E. coli* en PBS (1/10 del volumen de cultivo original) y se incubaron a 4 °C durante 1 hora en condiciones de agitación suave. Posteriormente, las células se centrifugaron una vez más y el sobrenadante, que contenía las proteínas secretadas en el espacio periplásmico, se almacenó.

9. Cribado

Los extractos periplásmicos (tal como se han descrito anteriormente) se analizaron en FACS para determinar la competición con Gro-α en la unión a CXCR2 humano. Se incubaron 2x10⁵ células con una dilución 1/2 de extractos periplásmicos en tampón de FACS (PBS + 10% de suero fetal bovino (Sigma, F7524)) durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, se añadió un volumen igual de Gro-α humano marcado con FMAT Blue 6 nM en tampón de FACS y la incubación se continuó durante otros 30 minutos a 4 °C en la oscuridad. Las células se lavaron entonces tres veces en tampón de FACS y finalmente se resuspendieron en tampón de 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 de los cuales los extractos periplásmicos presentaron competición con Gro-α en CXCR2 humano.

Tabla 7 - Competición con Gro- α en CXCR2 humano (extractos periplásmicos)

Nombre	Competición con Gro- α en FACS (% 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
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 en blanco	0,4

En otro montaje experimental, los extractos periplásmicos se analizaron para determinar la unión al péptido 1 a 19 humano mediante ELISA. Se recubrieron placas MaxiSorb (Nunc, 430341) durante dos horas con neutravidina seguidas de una hora de bloqueo (PBS, 1% de caseína). Posteriormente, se añadió péptido 1 a 19 humano biotinilado 100 nM a estas placas durante una hora (PBS, 0.1% de caseína, 0.05% de tween 20) seguida de una hora de incubación con diluciones por un factor 10 de los extractos periplásmicos. Los extractos periplásmicos no unidos se eliminaron mediante lavado (PBS suplementado con un 0.05% de tween 20) y los Nanocuerpos unidos se detectaron utilizando anti-myc de ratón (Roche, 11667149001) seguido de conjugado de HRP-antirratón de conejo (Dakocytomation, P0260). La Tabla 8 resume las relaciones de las señales de unión de Nanocuerpos anti-CXCR2 so-

bre un Nanocuerpo de control irrelevante.

Tabla 8 - Unión a péptido 1 a 19 de CXCR2 humano de los extractos periplásmicos

Nombre	ELISA de péptido 1-19 N ter (relación de señal de unión respecto al control en blanco)
54B12	75,5
53E7	13,3
97A9	0,8
127D1	39,5
137B7	1,0
137A8	1,2
139A8	1,0
139D5	0,8
139H2	1,7
159B10	0,8
163D2	0,5
163E3	0,6
2B2	58,6

10. Secuencias

Tabla 9 - Secuencias de Nanocuerpos anti-CXCR2 monovalentes

143B03	SEQ ID NO. 25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYWMYVWRQAPGKGLDWVSAIN AGGDSTYYADPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCATVRGTAR DLDYWGQGTQVTVSS
139D05	SEQ ID NO. 26	EVKLVESGGGLVQAGGSLRLSCALSGRIGSINAMGWYRQVSGQQR ELVAVSRSGGSTDIADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMDSLKPEDTAV YYCYAHTSSYSNWRVYNNDYWGQGTQVTVSS
146A06	SEQ ID NO. 27	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLTCAASGRIGTINAMGWYRQAPGKQR ELVAVITSGGRIDYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVY YYNVETVVGAVYWGQGTQVTVSS
147A01	SEQ ID NO. 28	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRMGINAMGWYRQAPGKER ELVAKITRGGAIYADSVKGRFTIARDNLTAYLQMNLSLKPEDTAVYY YNVDGGPSQNYWGQGTQVTVSS
145C09	SEQ ID NO. 29	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQAPGKERE RVSCISGSDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAV YYCAAYWGLTLRLWMPHRYDYWGQGTQVTVSS
145D03	SEQ ID NO. 30	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLIFRLSGMAWYRQAPGRQR EWWAVLT KDGLTHYADPVKGRFTISRNNAEWTYLMNSLKPEDTAI YYCNTGRYWGQGTQVTVSS
144D01	SEQ ID NO. 31	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGTIGTIRAMGWYRQAPGKQRE LVALITSTGRINYADSVKGRFTIGRDNKNTAYLQMNLSLKPEDTAVYY YNIETLRRNYWGQGTQVTVSS
139H02	SEQ ID NO. 32	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFSNYAMGWFRQATGKEREVAAI NKSGGNTHYAGSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAASRTN PKPDYWGQGTQVTVSS
139A08	SEQ ID NO. 33	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFSRSAMGWLQAPGKEREVAG ISWGGDINSYYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMNLSLKPEDTAVYYCAARYR GGAAGVAGWEYWGQGTQVTVSS
137A08	SEQ ID NO. 34	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTLAYTVGWFRAPGKEREGISCIS SSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAADRRTD CKKGRVGSWSWGQGTQVTVSS
143A05	SEQ ID NO. 35	KVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFNYYVMAWFRQAQGKEREVAAI STRGSMTKYSDSVQGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKPEDTAVYYCAADPRG SSWSFSSGGYDYWGQGTQVTVSS
137B07	SEQ ID NO. 36	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGPGRKAREWVAGI NSDGTNNYADPVKGRFTISRDNKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYCASGKYRGQ GTQVTVSS
127D01	SEQ ID NO. 37	EVQLVESGGGLVQAGESRLSCAASGSTFDKVMGWYRQPPGKQREGVAA IRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCKVNIRGQ DYWGQGTQVTVSS

(continuación)

126B11	SEQ ID NO. 38	EVQLVESGGGLVQAGGSLTSCAVSGSSFRINTMGWYRRAPGKQRELVAAR DRGGYINYVDSVKGRFTVSRDPAKPTMYLQMNSLKPEDTAVYYCHAGTQDR TGRNFDHWGQGTQVTSS
097A09	SEQ ID NO. 39	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQRELVADIT SGGNINYIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNAEIVLVGV WTQRARTGNYWGQGTQVTSS
159B10	SEQ ID NO. 40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSLSMGWFRQAPGKERAFVAA LTRNGGYRYADSVKGRFTISRDAKKTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAADSL GSDYLGTNLDYWGQGTQVTSS
163D02	SEQ ID NO. 41	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAI TWNGGRVFTASVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDR RTDYLGHVPVAYWGQGTQVTSS
163E03	SEQ ID NO. 42	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAI TWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGS SWLSFPPDYWGQGTQVTSS
2B2	SEQ ID NO. 43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQRELVRR TRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCMLDDRGGV YWGQGTQVTSS
54B12	SEQ ID NO. 90	EVQLVESGGGLVQAGGSLTSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQRELVAAR DRGGYINYVDSVKGRFTVSRDPAKPTMYLQMNSLKPEDTAVYYCHAGTQDR TGRNFDHWGQGTQVTSS

Nanocuerpos monovalentes para caracterización principales

11. Construcción de Nanocuerpos monovalentes

Los Nanocuerpos que contenían fragmentos de ADN, obtenidos mediante PCR en clones fagémidos funcionales con los cebadores Fwd-EVQL-MfeI y Rev-TVSS-BstEII (Tabla 1), se digirieron con *MfeI* y *BstEII*, ligados en el vector pAX100 y transformados en células competentes TG-1 de *E. coli*. El pAX100 es un vector de expresión procedente de pUC119 que contenía el promotor LacZ, un gen de resistencia a kanamicina, un sitio de multiclonación y la secuencia líder OmpA. En fase con la secuencia codificante del Nanocuerpo, el vector codificaba una etiqueta c-myc C terminal y una etiqueta His6. Los clones resistentes a kanamicina se analizaron para determinar la presencia de inserto y las secuencias de los clones positivos se verificaron.

12. Expresión a pequeña escala

Las células TG-1 que contenían vectores de expresión que codificaban los Nanocuerpos de interés se cultivaron en matraces de agitación deflectados que contenían medio TB más 100 µg/mL de kanamicina y se indujeron mediante adición de IPTG 1 mM para su expresión. Se permitió que la expresión prosiguiese durante 4 horas a 37 °C. Después de recoger las células, se prepararon extractos periplásmicos y los Nanocuerpos etiquetados con His6 se purificaron mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (HisTrap FF Crude, GE Healthcare) seguida de cromatografía de desalinización (HiPrep 26/10, GE Healthcare) o de filtración en gel (Superdex 75 HR16/10, GE Healthcare) en PBS.

13. Ensayo de competición de ligandos

Los Nanocuerpos anti-CXCR2 monovalentes purificados se valoraron frente a Gro-α marcado con FMAT-Blue 3 nM en el ensayo de competición de ligandos con FACS en CXCR2 humano y cinomolgo (Tabla 10). En CXCR2 humano, las concentraciones de bloqueo oscilan entre nM con dos dígitos y por debajo de nM, mientras que en CXCR2 de cinomolgo, oscilan entre nM con uno y dos dígitos.

Tabla 10 - Potencias de competición de ligandos de los Nanocuerpos anti-CXCR2 monovalentes

	CXCR2 humano		CXCR2 de cinomolgo	
	Cl ₅₀ (M)	% de inhibición de máx.	Cl ₅₀ (M)	% de inhibición de máx.
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 actividad				

14. Ensayos funcionales utilizando líneas celulares recombinantes*(1) Medición de la liberación de calcio intracelular inducida por agonistas (FLIPR)*

Se sembraron células RBL que expresaban receptor CXCR2 humano o cinomolgo en placas de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 37 °C. El día del experimento, las células se cargaron con tinte Fluo-4 durante 30 min a 37 °C, y después se incubaron durante 30 minutos con Nanocuerpos anti-CXCR2 monovalentes purificados. Finalmente, se llevó a cabo la adición de GRO- α utilizando un lector de placas por imagen fluorométrica (FLIPR, por sus siglas en inglés) seguida de 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 CXCR1 humano. El protocolo de ensayo continuó siendo el mismo descrito para CXCR2, sin embargo, se utilizó IL-8 como agonista. Un compendio de los valores de Cl₅₀ promedio se muestra en la Tabla 11, además, ninguno de los Nanocuerpos evaluados mostró ninguna inhibición de la liberación de calcio intracelular inducida por agonistas en el receptor CXCR1 con las concentraciones evaluadas (concentración máxima 1 μ M).

(2) Medición de la acumulación de [³⁵S]GTP γ S estimulada por agonistas

Se incubaron los Nanocuerpos anti-CXCR2 monovalentes purificados durante 60 minutos con GRO- α , GDP, microesferas de SPA y membranas de CHO-CXC2, preparadas a partir de células CHO que expresaban el receptor CXCR2 humano, en una placa de 96 pocillos. Esto se siguió de la adición de [³⁵S]GTP γ S y una incubación de 60 minutos adicional. Finalmente, la placa se centrifugó antes de leerla en el Topcount. Un compendio de los valores de Cl₅₀ promedio se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11- Valores de Cl₅₀ para los Nanocuerpos[®] anti-CXCR2 monovalentes purificados en ensayos funcionales utilizando líneas celulares recombinantes

	FLIPR		CXCR2 de cinomolgo		[³⁵ S]GTP γ S	
	Cl ₅₀ (M)	% de inhibición máx.	Cl ₅₀ (M)	% de inhibición máx.	Cl ₅₀ (M)	% de inhibición máx.
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
* Curvas fijadas a un 100% de inhibición, ya que no se obtuvo fase estacionaria con las concentraciones evaluadas. NA – no se pudo medir actividad. ND - no determinado						

15. Ensayos funcionales utilizando neutrófilos primarios*(1) Ensayo de cambio morfológico en sangre entera con neutrófilos humanos (hWBSC, por sus siglas en inglés)*

Los donantes fueron voluntarios normales sanos sin medicación sistémica (panel de donantes de Novartis Horsham). La sangre entera, anticoagulada con EDTA 52 mM (estéril) se recogió con una proporción de 1 mL de EDTA respecto a 9 mL de sangre. La sangre se recogió a temperatura ambiente y se precalentó hasta 37 °C antes del uso. Se preincubaron 80 μ L de sangre entera con Nanocuerpos de 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 añadieron 10 μ L de rhGRO α (concentración CE₇₀ aproximadamente 2 nM) a todos los pocillos excepto al compuesto cero, al cual

se añadieron 10 μ L de tampón de ensayo de cambio morfológico. Las muestras se agitaron cuidadosamente y se incubaron durante 5 minutos más a 37 °C. Los tubos se colocaron entonces en hielo y se añadieron 250 μ L de solución CellFix™ optimizada enfriada con hielo, los tubos se agitaron cuidadosamente y se incubaron durante 5 minutos más, tiempo tras el cual se añadieron 1.4 mL de solución de lisis de cloruro amónico 1X a todos los tubos y se dejaron en hielo durante 20 minutos más. Después de la lisis de eritrocitos, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). Las poblaciones celulares se identificaron mediante separación en cuanto a la dispersión frontal/dispersión lateral (FSC/SSC) y posteriormente mediante gráficos de FSC/FL-2 utilizando los granulocitos separados del primer gráfico. Los neutrófilos se distinguieron de los eosinófilos en el gráfico FL-2, ya que estos últimos tienen una autofluorescencia superior. Se contaron 5000 eventos por muestra.

(2) Ensayo de quimiotaxis de neutrófilos humanos

Los donantes fueron voluntarios normales sanos sin medicación sistémica (panel de donantes de Novartis Horsham). La sangre entera anticoagulada con EDTA 52 mM (estéril) se recogió con una proporción de 1 mL de EDTA respecto a 9 mL de sangre. Los leucocitos se aislaron utilizando protocolos estándar: se añadió un 4% de dextrano a 20 mL de sangre anticoagulada, se mezcló cuidadosamente, a continuación se incubó en hielo durante 30 minutos, para permitir que los eritrocitos sedimentasen. El sobrenadante que contenía células mononucleares de sangre periférica (PMN) se estratificó entonces en un gradiente de densidad Ficoll-Paque® y se centrifugó a 300 x g durante 25 min a 18 °C. La fracción rica en PMN se resuspendió en 500 μ L de PBS 1X y se llevó a cabo la lisis de eritrocitos utilizando un choque hipotónico. Se añadieron 20 mL de agua destilada exenta de endotoxinas estéril enfriada con hielo al pellet y se dejó que tuviera lugar la lisis durante 30-40 segundos antes de añadir 20 mL de PBS 2x. La muestra se mezcló cuidadosamente y se centrifugó a 300 x g durante 10 min a 18 °C para obtener los granulocitos. El pellet de granulocitos se resuspendió en 500 μ L de PBS 1x y se lavó dos veces con 50 mL de PBS 1x. El pellet de granulocitos se resuspendió en RPMI 1640, pH 7.4, más un 2.5% de FBS, se sometió a recuento y se diluyó hasta una concentración final de 2×10^6 /mL. La migración se midió utilizando placas Transwell con membranas de PET 3 μ m de Becton Dickinson. En resumen, se añadió una concentración 6 nM de GRO α (CE₈₀-CE₁₀₀) a los pocillos inferiores (1000 μ L/pocillo) de la placa antes de bajar el inserto multipocillo a su posición, las PMN que se habían preincubado con diferentes concentraciones de Nanocuerpo (0.13-1000 nM para monovalentes o 0.6 pM-30 nM para biparatópicos) durante 30 minutos a TA se añadieron entonces al inserto (500 μ L/pocillo). Las placas se incubaron posteriormente a 37 °C durante 90 minutos, las células que habían migrado hacia la cámara inferior se contaron utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur. El citómetro de flujo se ajustó para que contase el número de eventos dentro de la región R2 en el gráfico FSC/FL-2 durante un tiempo establecido de 20 segundos por muestra.

(3) Ensayo de cambio morfológico en sangre entera con neutrófilos de cinomolgo (CynoWBSC, por sus siglas en inglés)

La sangre venosa tomada del antebrazo o la pierna se anticoaguló con un 3.8% de citrato sódico (estéril) con una proporción de 1 mL de citrato sódico respecto a 9 mL de sangre. La sangre se recogió a temperatura ambiente y se precalentó hasta 37 °C antes del uso. Se preincubaron 80 μ L de sangre entera con Nanocuerpos de CXCR2 durante 10 min a temperatura ambiente (respuesta de 10 puntos por dosis (0.03 - 1.144×10^{-7} μ M), antes de la estimulación con quimiocina; se añadieron 10 μ L de rhGRO α (una concentración de aproximadamente CE₇₀₋₉₀ 30 nM) a todos los pocillos excepto al compuesto cero, al cual se añadieron 10 μ L de tampón de ensayo de cambio morfológico. Las muestras se agitaron cuidadosamente y se incubaron durante 5 minutos más a 37 °C. A continuación, los tubos se colocaron en hielo y se añadieron 250 μ L de solución CellFix™ optimizada enfriada con hielo, los tubos se agitaron cuidadosamente y se incubaron durante 5 minutos adicionales, periodo tras el cual se añadieron 2 mL de tampón de lisis (Sigma Aldrich #R7757) a todos los tubos y se dejaron en hielo durante 40-60 minutos más. Después de la lisis de eritrocitos, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). Las poblaciones celulares se identificaron mediante separación en cuanto a la dispersión frontal/dispersión lateral (FSC/SSC) y posteriormente mediante gráficos de FSC/FL-2 utilizando los granulocitos separados del primer gráfico. Los neutrófilos se distinguieron de los eosinófilos en el gráfico FL-2, ya que estos últimos tienen una autofluorescencia superior. Se contaron 5000 eventos por muestra.

Tabla 12 - Valores de Cl₅₀ para Nanocuerpos anti-CXCR2 monovalentes purificados en ensayos funcionales utilizando neutrófilos primarios y rhGRO α

	Cl ₅₀ de WBSC humano (nM)	Cl ₅₀ de WBSC de cinomolgo (nM)	Cl ₅₀ de quimiotaxis humana (nM)
163D2	6,6 $\pm$ 3,1	>100	
127D1	4,9 $\pm$ 2,9	>100	3,9
97A9	11,6 $\pm$ 5,47	>100	4,8
163E3	9,4 $\pm$ 6,2	>100	1,3
54B12	19,7	>100	
2B2	29,5 $\pm$ 23,4	>100	50

Nanocuerpos multivalentes**16. Construcción de Nanocuerpos bivalentes**

Se utilizaron dos estrategias para construir Nanocuerpos bivalentes.

- 5 Se llevaron a cabo amplificaciones por PCR en ADN plasmídico que codificaba los componentes monovalentes. El componente N terminal se amplificó utilizando Fwd-EVQL-MfeI y un cebador inverso que codificaba parte del conector de GlySer, mientras que el componente C terminal se amplificó utilizando un cebador directo que codificaba la parte restante del conector de GlySer y Rev-TVSS-BstEII (Tabla 6). El fragmento N terminal se digirió con MfeI y BamHI, el fragmento C terminal se digirió con BamHI y BstII; posteriormente estos se ligaron de forma simultánea en el vector pAX100 y se transformaron en células competentes TG-1 de *E. coli*.
- 10 Como alternativa, se llevaron a cabo amplificaciones por PCR diferentes en ADN plasmídico que codificaba los componentes monovalentes. El componente N terminal se amplificó utilizando Fwd-EVQL-MfeI y Rev-TVSS-BspEI, mientras que el componente C terminal se amplificó utilizando Fwd-EVQL-BamHI y Rev-TVSS-BstEII (Tabla 6). El fragmento N terminal se digirió con MfeI y BamHI, el fragmento C terminal se digirió con BspEI y BstII. El fragmento N terminal se ligó (MfeI-BspEI) en un derivado de pAX100 que contenía la información de codificación para el conector de GlySer y se transformó en células competentes TG-1 de *E. coli*. Se preparó ADN plasmídico a partir de esta mezcla de transformación y se digirió con BspEI y BstEII y el fragmento C terminal se ligó entonces en el vector pAX100 y se transformó en células competentes TG-1 de *E. coli*.
- 15

Los clones resistentes a kanamicina se analizaron para determinar la presencia de inserto y las secuencias de los clones positivos se verificaron.

20 **17. Secuencias de Nanocuerpos anti-CXCR2 multivalentes**

TABLA 13

CXCR20011	97A9-35GS-97A9 SEQ ID NO. 44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNA EIVVLGVWVTQRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASG SIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNKNT TVYLQMNSLKPEDTAVYYCNAEIVVLGVWVTQRARTGNYWGQGTQVT VSS
CXCR20012	137B7-35GS-137B7 SEQ ID NO. 45	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGP GKAREW VAGINS DGT TNYADPVKGRFTISRDNKNTIYLHMDMLKPEDTAVYYCA SGKYRGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWTRQGP GKAREWVAGINS DGT TNYADPVKGRFTISRDNKNTIYLHMDMLKPED TAVYYCASGKYRGQGTQVTVSS
CXCR20013	2B2-35GS-97A9 SEQ ID NO. 46	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADI AKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWY RQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCNAEIVVLGVWVTQRARTGNYWGQGTQVTVSS
CXCR20014	97A9-35GS-2B2 SEQ ID NO. 47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNA EIVVLGVWVTQRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASG SILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADI AK KTMYLQMNSLKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
CXCR20015	2B2-35GS-137B7 SEQ ID NO. 48	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADI AKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIFRLSALGWT RQGP GKAREWVAGINS DGT TNYADPVKGRFTISRDNKNTIYLHMDML KPEDTAVYYCASGKYRGQGTQVTVSS

(continuación)

CXCR20016	137B7-35GS-2B2 SEQ ID NO. 49	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIIFRLSALGWTRQGP GKAREW VAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNANTYIYHMDMLKPEDTAVYYCA SGKYRGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAP GKQRELVVRRTRGSTTYQDSVKGRFTISADI AKKTMYLQMNSLKPED TAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
CXCR20017	97A9-35GS-137B7 SEQ ID NO. 50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNANTYVYLQMNSLKPEDTAVYYCNA EIVVLVGWVTQRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGI IFRLSALGWTRQGP GKAREWVAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDN NTIYHMDMLKPEDTAVYYCASGKYRGQGTQVTVSS
CXCR20018	137B7-35GS-97A9 SEQ ID NO. 51	EVQLVESGGGLVQPGGSVRLSCVASGIIIFRLSALGWTRQGP GKAREW VAGINSDGTTNYADPVKGRFTISRDNANTYIYHMDMLKPEDTAVYYCA SGKYRGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTP GKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNANTYVYLQMNSLKPEDTA VYYCNAEIVVLVGWVTQRARTGNYWGQGTQVTVSS
CXCR20019	2B2-9GS-2B2 SEQ ID NO. 52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VVRRTRGSTTYQDSVKGRFTISADI AKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG LRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VVRRTRGSTTYQDSVK RFTISADI AKKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVT VSS
CXCR20020	127D1-35GS-163D2 SEQ ID NO. 53	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFDFKVMGWYRQPPGKQRE GVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYY CKVNIRGQDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAM GWFRQAPGKERE FVAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNANTMYL QMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSS
CXCR20021	127D1-35GS-163E3 SEQ ID NO. 54	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSTFDFKVMGWYRQPPGKQRE GVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYY CKVNIRGQDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAM GWFRQAPGKERE FVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNANTVYL QMNSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
CXCR20022	163D2-35GS-163D2 SEQ ID NO. 55	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKERE FVAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNANTMYLQMNSLKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS GRTFSDYAMGWFRQAPGKERE FVAAITWNGGRVFYASVKGRFTISR DNANTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGT QVTVSS
CXCR20023	163D2-35GS-163E3 SEQ ID NO. 56	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKERE FVAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNANTMYLQMNSLKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS GRIFSSNAMGWFRQAPGKERE FVAAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISR DNANTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVT VSS
CXCR20024	163E3-35GS-163E3 SEQ ID NO. 57	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKERE FVAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDNANTVYLQMNSLKPEDTAVY YCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRI FSSNAMGWFRQAPGKERE FVAITWRSGGSAYYADSAKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
CXCR20025	163D2-35GS-127D1 SEQ ID NO. 58	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKERE FVAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNANTMYLQMNSLKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAAS GSTFDFKVMGWYRQPPGKQREGVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKA NAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQVTVSS

(continuación)

CXCR20026	163E3-35GS-127D1 SEQ ID NO. 59	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREF VAAITWRSAGSAYYADSAKGRFTISRDNANTVYLQMNSLKPEDTAVY YCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGST FDFKVMGWYRQPPGKQREGVAAIRLSGNMHYAESVKGRFTISKANAK NTVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGTQVTVSS
CXCR20027	163E3-35GS-163D2 SEQ ID NO. 60	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREF VAAITWRSAGSAYYADSAKGRFTISRDNANTVYLQMNSLKPEDTAVY YCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGR TFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDN KNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTV SS
CXCR20028	97A9-35GS-54B12 SEQ ID NO. 61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIVRINTMGWYRQTPGKQREL VADITSGGNINYIDAVKGRFTISRDNNTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNA EIVLVGVWTQRARTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSG STFRINTMGWYRRAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDN AKPTMYLQMNSLKPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFRDWGQGTQVTVS S
CXCR20029	163E3-35GS-54B12 SEQ ID NO. 62	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREF VAAITWRSAGSAYYADSAKGRFTISRDNANTVYLQMNSLKPEDTAVY YCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGST FRINTMGWYRRAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDN PTMYLQMNSLKPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFRDWGQGTQVTVSS
CXCR20030	163D2-35GS-54B12 SEQ ID NO. 63	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSDYAMGWFRQAPGKEREF VAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNANTMYLQMNSLKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVS GSTFRINTMGWYRRAPGKQRELVAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRD NAKPTMYLQMNSLKPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNFRDWGQGTQVTV SS
CXCR20031	2B2-35GS-163E3 SEQ ID NO. 64	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKMYLQMNSLKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGW FRQAPGKEREFVAAITWRSAGSAYYADSAKGRFTISRDNANTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS
CXCR20032	2B2-35GS-163D2 SEQ ID NO. 65	EVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSILTINAMGWYRQAPGKQREL VRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKKMYLQMNSLKPEDTAVYYCM LDDRGGVYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSDYAMG WFRQAPGKEREFVAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNANTMYLQ MNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSS
CXCR20033	163E3-35GS-2B2 SEQ ID NO. 66	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREF VAAITWRSAGSAYYADSAKGRFTISRDNANTVYLQMNSLKPEDTAVY YCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAASGSI LTINAMGWYRQAPGKQRELVRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIAKK TMYLQMNSLKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
CXCR20034	163D2-35GS-2B2 SEQ ID NO. 67	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSDYAMGWFRQAPGKEREF VAAITWNGGRVFYASVKGRFTISRDNANTMYLQMNSLKPEDTAVY YCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGELVQPGGSLRLSCAAS GSILTINAMGWYRQAPGKQRELVRRTRGGSTTYQDSVKGRFTISADIA KKTMYLQMNSLKPEDTAVYYCMLDDRGGVYWGQGTQVTVSS
CXCR20035	54B12-35GS-163E3 SEQ ID NO. 68	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQREL VAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDNANTMYLQMNSLKPEDTAVYYC HAGTQDRTGRNFRDWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRIFS SNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSAGSAYYADSAKGRFTISRDN ANTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGSSWLSFPPDYWGQGTQVTVSS

(continuación)

CXCR20036	54B12-35GS-163D2 SEQ ID NO. 69	EVQLVESGGGLVQAGGSLTSCAVSGSTFRINTMGWYRRAPGKQREL VAARDRGGYINYVDSVKGRFTVSRDPAKPTMYLQMNSLKPEDTAVYYC HAGTQDRTGRNFDWRWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRSCAASGRFTS DYAMGWFRQAPGKEREFVAITWNGGRVFTASVKGRFTISRDAKN TMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPAYWGQGTQVTVSS
------------------	--	--

18. Ensayo de competición de ligandos

Los Nanocuerpos anti-CXCR2 multivalentes se valoraron frente a Gro- α marcado con FMAT-Blue 3 nM en el ensayo de competición de ligandos con FACS en CXCR2 humano y cinomolgo (Tabla 14). En CXCR2 humano, las concentraciones de bloqueo oscilan entre nM con dos dígitos y por debajo de nM, mientras que en CXCR2 de cinomolgo, oscilan entre nM con uno y dos dígitos.

5

Tabla 14 - Análisis de competición de ligandos de Nanocuerpos anti-CXCR2 multivalentes

		CXCR2 humano		CXCR2 de cinomolgo	
		Cl ₅₀ (M)	% de inhibición de máx.	Cl ₅₀ (M)	% de inhibición de máx.
CXCR20011	97A9-35GS-97A9	3,52E-08	99,0	9,74E-08	60,0
CXCR20012	137B7-35GS-137B7	6,06E-10	99,1	ND	ND
CXCR20013	2B2-35GS-97A9	9,00E-10	90,0	4,20E-09	98,5
CXCR20014	97A9-35GS-2B2	1,59E-09	99,7	3,90E-09	98,5
CXCR20015	2B2-35GS-137B7	7,00E-10	99,0	9,90E-08	81,5
CXCR20016	137B7-35GS-2B2	8,00E-10	100,0	5,70E-09	88,0
CXCR20017	97A9-35GS-137B7	3,40E-09	99,0	2,95E-08	73,0
CXCR20018	137B7-35GS-97A9	1,90E-09	98,0	5,08E-08	47,0
CXCR20019	2B2-9GS-2B2	4,40E-11	50,6	1,8E-09	81,0
CXCR20020	127D1-35GS-163D2	9,90E-10	100,0	1,78E-09	98,5
CXCR20021	127D1-35GS-163E3	1,09E-09	99,5	1,85E-09	98,5
CXCR20022	163D2-35GS-163D2	4,14E-09	100,0	8,01E-09	98,0
CXCR20023	163D2-35GS-163E3	4,28E-09	99,0	6,61E-09	96,0
CXCR20024	163E3-35GS-163E3	5,27E-09	99,0	5,32E-09	95,0
CXCR20025	163D2-35GS-127D1	9,00E-10	99,0	2,08E-09	98,5
CXCR20026	163E3-35GS-127D1	9,00E-10	99,5	1,82E-09	99,0
CXCR20027	163E3-35GS-163D2	4,90E-09	100,0	6,42E-09	97,0
CXCR20028	97A9-35GS-54B12	1,63E-09	98,5	3,80E-09	96,0
CXCR20029	163E3-35GS-54B12	1,13E-09	98,5	2,09E-09	98,5
CXCR20030	163D2-35GS-54B12	7,86E-10	99,5	1,74E-09	98,5
CXCR20031	2B2-35GS-163E3	4,90E-10	100,0	1,98E-09	99,0
CXCR20032	2B2-35GS-163D2	5,00E-10	100,0	1,91E-09	99,0
CXCR20033	163E3-35GS-2B2	6,50E-10	100,0%	2,20E-09	99,0%

(continuación)

		CXCR2 humano		CXCR2 de cinomolgo	
		Cl ₅₀ (M)	% de inhibición de máx.	Cl ₅₀ (M)	% de inhibición de máx.
CXCR20034	163D2-35GS-2B2	8,00E-10	100,0%	2,55E-09	99,0%
CXCR20035	54B12-35GS-163E3	1,00E-09	99,0%	3,23E-09	99,0%
CXCR20036	54B12-35GS-163D2	7,00E-10	98,0%	2,27E-09	98,0%
ND: no determinado					

19. Ensayos funcionales utilizando líneas celulares recombinantes

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

Se sembraron células RBL que expresaban receptor CXCR2 humano o cinomolgo en placas de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 37 °C. El día del experimento, las células se cargaron con tinte Fluo-4 durante 30 min a 37 °C y posteriormente se incubaron 30 minutos con Nanocuerpos anti-CXCR2 multivalentes purificados. Finalmente, se llevó a cabo la adición de GRO- α utilizando un lector de placas de imagen fluorométrica (FLIPR, por sus siglas en inglés) seguida de 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 CXCR1 humano, con IL-8 como agonista y células CEM que expresaban de forma endógena CXCR4 humano con SDF-1 como agonista, sin embargo, el protocolo de ensayo continuó siendo el mismo descrito para CXCR2. Un compendio de los valores de Cl₅₀ se muestra en la Tabla 15, además, ninguno de los Nanocuerpos evaluados mostró ninguna inhibición de la liberación de calcio intracelular inducida por agonistas en CXCR1 ni en CXCR4 con las concentraciones evaluadas (concentración máxima de 1 μ M).

(2) Medición de la acumulación de [³⁵S]GTP γ S estimulada por agonistas

Los Nanocuerpos anti-CXCR2 multivalentes purificados se incubaron durante 60 minutos con agonista (GRO- α , IL-8 o ENA-78) GDP, microesferas de SPA y membranas de CHO-CXC2 preparadas a partir de células CHO que expresaban el receptor CXCR2 humano, en una placa de 96 pocillos. Esto se siguió de la adición de [³⁵S]GTP γ S y una incubación de 60 minutos adicional. Finalmente, la placa se centrifugó antes de leerla en el Topcount. Un compendio de los valores de Cl₅₀ promedio se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15 - Valores de Cl₅₀ para 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	
		Cl ₅₀ (M)	% de inhibición de máx.	Cl ₅₀ (M)	% de inhibición de máx.
CXCR20011	97A9-35GS-97A9	1,37E-7	100	ND	ND
CXCR20012	137B7-35GS-137B7	ND	ND	ND	ND
CXCR20013	2B2-35GS-97A9	2,93E-9	100	2,92E-8	100
CXCR20014	97A9-35GS-2B2	6,84E-9	100	1,37E-8	100
CXCR20015	2B2-35GS-137B7	2,78E-9	100	2,87E-6	100*
CXCR20016	137B7-35GS-2B2	2,36E-9	100	1,10E-6	100*
CXCR20017	97A9-35GS-137B7	2,29E-8	100	1,08E-6	100*
CXCR20018	137B7-35GS-97A9	ND	ND	ND	ND
CXCR20019	2B2-9GS-2B2	ND	ND	ND	ND

(continuación)

		CXCR2 humano		CXCR2 de cinomolgo	
		CI ₅₀ (M)	% de inhibición de máx.	CI ₅₀ (M)	% de inhibición de máx.
CXCR20020	127D1-35GS-163D2	6,98E-9	100	1,64E-9	100
CXCR20021	127D1-35GS-163E3	7,32E-9	100	2,31E-9	100
CXCR20022	163D2-35GS-163D2	9,34E-9	100	8,64E-9	100
CXCR20023	163D2-35GS-163E3	1,48E-8	100	1,20E-8	100
CXCR20024	163E3-35GS-163E3	2,64E-8	100	1,18E-8	100
CXCR20025	163D2-35GS-127D1	1,22E-8	100	7,88E-9	100
CXCR20026	163E3-35GS-127D1	1,23E-8	100	9,10E-9	100
CXCR20027	163E3-35GS-163D2	1,78E-8	100	1,27E-8	100
CXCR20028	97A9-35GS-54B12	2,19E-8	100	1,70E-8	100
CXCR20029	163E3-35GS-54B12	1,71E-8	100	1,01E-8	100
CXCR20030	163D2-35GS-54B12	1,18E-8	100	6,36E-9	100
CXCR20031	2B2-35GS-163E3	1,52E-8	100	4,26E-9	100
CXCR20032	2B2-35GS-163D2	1,47E-8	100	3,65E-9	100
CXCR20033	163E3-35GS-2B2	1,79E-8	100	4,46E-9	100
CXCR20034	163D2-35GS-2B2	1,18E-8	100	9,47E-9	100
CXCR20035	54B12-35GS-163E3	1,02E-8	100	8,72E-9	100
CXCR20036	54B12-35GS-163D2	7,86E-9	100	4,27E-9	100
* Curvas fijadas a un 100% de inhibición, ya que no se obtuvo fase estacionaria con las concentraciones evaluadas. ND - no determinado.					

Tabla 16 - Valores de Cl_{50} para Nanocuerpos anti-CXCR2 multivalentes purificados en un ensayo funcional que mide la acumulación de [35 S]GTPyS en membranas de células CHO-CXCR2 humanas

		CXCR2 humano (utilizando agonistas diferentes)					
		GRO- α		IL-8		ENA-78	
		Cl_{50} (M)	% inhibición de máx.	Cl_{50} (M)	% inhibición de máx.	Cl_{50} (M)	% inhibición de máx.
CXCR20014	97A9-35GS-2B2	1,38E-9	100	1,13E-9	100	1,66E-9	100
CXCR20020	127D1-35GS-163D2	6,34E-10	100	6,19E-10	100	7,07E-10	100
CXCR20021	127D1-35GS-163E3	5,51E-10	100	8,27E-10	100	7,87E-10	100
CXCR20022	163D2-35GS-163D2	2,85E-8	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20023	163D2-35GS-163E3	2,66E-8	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20024	163E3-35GS-163E3	3,03E-8	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20025	163D2-35GS-127D1	8,91E-10	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20026	163E3-35GS-127D1	8,09E-10	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20028	97A9-35GS-54B12	1,38E-9	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20030	163D2-35GS-54B12	1,02E-9	100	1,09E-9	100	1,30E-9	100
CXCR20031	2B2-35GS-163E3	ND	ND	8,40E-10	100	1,38E-9	100
CXCR20032	2B2-35GS-163D2	ND	ND	9,97E-10	100	1,16E-10	100
CXCR20033	163E3-35GS-2B2	1,01E-9	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20034	163D2-35GS-2B2	9,95E-10	100	ND	ND	ND	ND
CXCR20035	54B12-35GS-163E3	8,44E-10	100	7,17E-10	100	1,17E-9	100
ND – 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 [35 S]GTPyS estimulada con IL-8 y GRO- α . Este formato de ensayo permite alcanzar el equilibrio entre agonista y Nanocuerpo antes de la adición de [35 S]GTPyS y, como consecuencia, se deberían evitar cualesquiera artefactos de hemiequilibrio que podrían dar lugar a una interpretación errónea del mecanismo. Para hacer esto, se determinaron las curvas de respuesta a la concentración de agonista en presencia de concentraciones crecientes de Nanocuerpo. Los datos para los dos Nanocuerpos monovalentes 54B12 y 163E3 y el Nanocuerpo multivalente resultante se proporcionan como ejemplos. Los datos muestran las curvas de respuesta a la concentración para GRO- α , pero se observaron datos similares cuando se

utilizó IL-8.

Los Nanocuerpos monovalentes 54B12 y 163E3 muestran ambos un mecanismo de acción alostérico, pero con efectos diferenciales en la inhibición del agonista. El mecanismo alostérico de 54B12 y otros ligantes de 1-19 se ilustra mediante los desplazamientos paralelos hacia la derecha de la curva de respuesta a la concentración de agonista con concentraciones de Nanocuerpo bajas, que no se desplazan más hacia la derecha en presencia de concentraciones crecientes de Nanocuerpo. La naturaleza saturable de este efecto, sin una disminución de la respuesta al agonista máxima es indicativa de efectos alostéricos en la afinidad del agonista. Por el contrario, el mecanismo alostérico de 163E3 y otros ligantes de 1-19 se ilustra mediante los desplazamientos paralelos a la derecha de la curva de respuesta a la concentración de agonista combinados con reducciones en la respuesta al agonista máxima con concentraciones superiores de Nanocuerpo. Este efecto puede ser saturable, pero esto no se observó con las concentraciones utilizadas, sin embargo, la observación clave es la reducción de la respuesta al agonista máxima, la cual es indicativa de efectos alostéricos en la eficacia del agonista. Finalmente, el Nanocuerpo multivalente 54B12-163E3 combina ambos mecanismos alostéricos para producir efectos en la curva de respuesta a la concentración de agonista que se ilustran mediante los desplazamientos paralelos hacia la derecha con concentraciones de Nanocuerpo muy inferiores y una disminución significativa de la respuesta al agonista máxima.

La definición actual de un modulador alostérico es que se une en un sitio diferente del sitio de unión del agonista (ligando ortoestérico) y que tanto el ligando ortoestérico como el modulador alostérico se unen al receptor a la vez. Aunque los inventores no poseen actualmente los datos para confirmar este hecho y, sin desear ceñirse a la teoría, no se cree que el sitio de unión del Nanocuerpo sea diferente del sitio de unión del agonista, sino que los sitios de unión se superponen. No existen datos disponibles para mostrar que tanto el agonista como el Nanocuerpo se unen al receptor a la vez, aunque los datos del análisis de Schil sugerirían que estos Nanocuerpos son moduladores alostéricos de CXCR2.

20. Ensayos funcionales - NSC

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

Tabla 17 - Valores de Cl_{50} para los Nanocuerpos anti-CXCR2 biparatópicos purificados en ensayos funcionales utilizando neutrófilos humanos o de cinomolgo primarios (frente a rhGRO α , media $\pm$ DE)

	Cl_{50} de humano (nM)	Cl_{50} de WBSC de cinomolgo (nM)	Cl_{50} de quimiotaxis humana (nM)
97A9-2B2	0,445 $\pm$ 0,08	0,16 $\pm$ 0,16	0,16
163D2-2B2	0,29 $\pm$ 0,17	0,44 $\pm$ 0,14	0,145
163E3-2B2	0,345 $\pm$ 0,15	0,42 $\pm$ 0,12	0,145
127D1-163D2	0,17	0,12 $\pm$ 0,09	0,145
163E3-127D1	0,165 $\pm$ 0,06	0,26 $\pm$ 0,25	0,14
97A9-54B12	0,43 $\pm$ 0,18	1,72 $\pm$ 0,43	
163D2-54B12	0,215 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,46	
54B12-163E3	0,24 $\pm$ 0,155	0,43 $\pm$ 0,38	

TABLA 18 –

143B03	SEQ ID NO. 192	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTC AGTACCTACTGGATGTATTGGGTCCGTGAGGCTCCAGGGAAGGG GCTCGACTGGGTCTCAGCTATTAATGCTGGTGGTGATAGCACAT ACTATGCAGACCCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC AACAACAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAACC TGAGGACACGGCCCTGTATTACTGTGCGACCGTACGAGGCACA GCTCGTGACTTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCG TCTCTCA
---------------	----------------	---

(continuación)

139D05	SEQ ID NO. 193	GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCACTCTCTGGAAGGATCGGC AGTATCAACGCCATGGGCTGGTATCGCCAGGTTTCAGGACAACA GCGCGAGTTGGTCGCAGTAAGCAGGAGCGGAGGTAGCACAGAC ATTGCTGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAA CGGCAAGAACACAGTGTATCTGCAGATGGACAGCCTGAAACCTG AGGACACGGCCGTCTATTACTGTTATGCTCATACTTCAAGCTATA GTAATTGGCGAGTCTACAATAACGACTACTGGGGCCAGGGGACC CAGGTCACCGTCTCCTCA
146A06	SEQ ID NO. 194	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTTACCTGTGACGCTCTGGACGCATCGG CACTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAG CAGCGCGAGTTGGTCGCAGTTATTACTAGTGGTGGTAGGATAGA CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA ATGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCT GAGGACACGGCCGTCTATTACTATAATGTAGAAACGGTAGTGGG TGCCGTCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
147A01	SEQ ID NO. 195	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGACGCTCTGGAAGGATGGG CAATATCAATGCCATGGGCTGGTATCGCCAGGCTCCAGGGAAGG AGCGCGAGTTGGTCGCAAAAATTACTAGGGGTGGTGCAGATAACC TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCGCCAGAGACAA TATTCTGAACACGGCGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGA GGACACGGCCGTCTATTATTATAATGTAGATGGGGGGCCAGTC AAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
145C09	SEQ ID NO. 196	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGACGCTCTGGATTCACTTTC GATGATTATGCCATAGGCTGGTTCGCCAGGCCCCAGGGAAGG AGCGTGAGAGGGTCTCATGTATTAGTGGTAGTGATGGTAGCACA TACTATGCAGACTCCGTCAAGGGCCGATTACCATCTCCAGTGA CAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAAC CCGAGGACACGGCCGTTTATTATTGTGCAGCATATTGGGGACTA ACGCTCAGGCTATGGATGCCCCCCCACCGGTATGACTACTGGG GCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
145D03	SEQ ID NO. 197	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGCCTCTCCTGTGACGCTCTGGACTTATCTTC AGACTCAGTGGCATGGCCTGGTATCGCCAGGCTCCGGGGAGGC AGCGCGAGTGGGTGCGAGTGCTTACCAAAGATGGTACCCTACAC TATGCAGACCCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAAACAA CGCCGAGAACACGTGGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG AGGACACAGCCATCTATTACTGTAATACGGGCCGTTACTGGGGC CAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
144D01	SEQ ID NO. 198	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCACTGAGACTCTCCTGTGACGCTCTGGAACCATCGG CACGATCAGAGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAG CAGCGCGAGTTGGTCGCATTGATTACTAGTACTGGTAGGATAAA CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATTTGGAAGAGACA ATGCCAAGAACACGGCGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAACCT GAGGACACGGCCGTCTATTACTATAATATCGAAACACTACGACGT AACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

(continuación)

139H02	SEQ ID NO. 199	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTT AGTAACTATGCCATGGGCTGGTTCGCCAGGCCACAGGGAAGG AGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTAACAAGAGTGGTGGGAACACA CACTATGCAGGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTAGGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCGTCGCGGACTAAC CCTAAGCCTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCT CCTCA
139A08	SEQ ID NO. 200	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTG GGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCTCCTTC AGTCGAGTGCCATGGGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG AGCGTGAATTTGTAGCAGGTATTAGCTGGGGTGGTGATAACTCA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CAACGCCAAGAACACCGTGTCTCTACAAATGAACAGCCTGAAAC CTCAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAAGATACCGGGGA GGCGCGGCAGTAGCTGGTTGGGAGTACTGGGGCCAGGGGACC CAGGTCACCGTCTCCTCA
137A08	SEQ ID NO. 201	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATCCACTTTG GCCTATTATACCGTAGGCTGGTTCGCCGGGGCCAGGGAAGG AGCGCGAGGGGATCTCATGTATTAGTAGTAGTGATGGTAGCACA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CAATGCCAAGAATACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGGCTGACAGACGTACC GACTGTAAAAAGGGTAGAGTCGGTTCTGGTTCCTGGGGCCAGG GGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
143A05	SEQ ID NO. 202	AAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGGCT GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGACGCGCCT TCAATTACTATGTCATGGCCTGGTTCGCCAGGCTCAAGGGAAG GAGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTAGCACGCGTGGTAGTATGAC AAAGTATTCAGACTCCGTGCAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAG ACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCACATGAACAGCCTGAAA CCTGAGGATACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAGACCTCGCGG CAGTAGCTGGTCATTTTCGTCCGGGGTTATGACTACTGGGGCC AGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
137B07	SEQ ID NO. 203	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTGTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGAATCATCTTC AGACTCAGTGCGTTGGGTTGGACACGCCAGGGTCCAGGAAAGG CGCGCGAGTGGGTCGCAGGTATTAACAGTGATGGTACGACCAA CTACGCCGACCCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA ACGCCAAGAACACGATATATCTGCACATGGACATGCTGAAACCT GAGGATACGGCCGTCTATTACTGTGCCTCCGGAAGTACCGGG GCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
127D01	SEQ ID NO. 204	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGAGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCACCTTC GATTTCAAAGTCATGGGCTGGTACCGCCAGCCTCCAGGGAAGCA GCGCGAGGGGGTGCAGCGATTAGGCTTAGTGGTAACATGCAC TATGCAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAAAGCCAA CGCCAAGAACACAGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTG AGGACACGGCCGTCTATTACTGTAAGGTGAACATTCGGGGCCAG GACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA

(continuación)

126B11	SEQ ID NO. 205	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGACGCTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAAGCTCCTTC AGAATCAATACCATGGGCTGGTACCGCCGGGCTCCAGGGAAGC AGCGCGAGTTGGTCGCAGCTCGTGATAGAGGTGGTTACATAAAC TATGTAGATTCCGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAA CGCCAAGCCCACAATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG AGGACACGGCCGTCTATTATTGTCATGCCGGGACCCAAGATCGG ACGGGTCCGAATTCGACCACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCA CCGTCTCCTCA
097A09	SEQ ID NO. 206	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGAAGCATCGTC AGAATTAATACCATGGGCTGGTACCGCCAGACTCCAGGGAAGCA GCGCGAGTTGGTCGCAGATATTACAGTGGTGGTAACATAAACT ATATAGACGCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAAC ACCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGA GGACACGGCCGTCTATTACTGTAATGCAGAGATCGTTGTTCTGG TGGGAGTTTGACCCAGCGTGC GCGGACCGGCAACTACTGGGG CCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
159B10	SEQ ID NO. 207	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCCTG GGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACGTTT AGTAGCTTGTCCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGG AGCGTGCCCTTTGTAGCAGCGCTTACTCGAAATGGTGGTTACAGA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CGTCGCCAAGAAGACCTTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCAGCAGATAGTCTTAGT GGTAGTGACTACTTAGGAACCAACCTAGACTACTGGGGCCAGGG GACCCAGGTACCGTCTCCTCA
163D02	SEQ ID NO. 208	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTG GGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTC AGTGACTATGCCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG AGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTACGTGGAATGGTGGTAGAGTA TTTATACTGCCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA CAACGCCAAGAACACGATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAC CTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCAGATAAAGACAGA CGTACTGACTATCTAGGGCACCCCGTTGCCTACTGGGGCCAGG GGACCCAGGTACCGTCTCCTCA
163E03	SEQ ID NO. 209	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGCCTG GGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGACGCATCTTC AGTAGCAATGCCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG AGCGTGAGTTTGTAGCGGCCATTACCTGGAGGAGTGGCGGTAG CGCGTACTATGCAGACTCCGCGAAGGGCCGATTACCATCTCCA GAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATTTGCAAATGAACAGCCTG AAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTATTGTGCAGCTGGTGGTAG TTCCTGGTTAAGTTTCCGCCGGAAGTACTGGGGCCAGGGGACCC AGGTACCGTCTCCTCA
2B2	SEQ ID NO. 210	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGAGTTGGTGCAGCCG GGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTT AACTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAG CAGCGCGAGTTGGTAGTCCGTAGGACTAGGGGTGGTAGTACAA CGTATCAAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCGAGAC ATTGCCAAGAAAACGATGTATCTCAAATGAACAGCCTGAAACCT GAAGACACGGCCGTCTATTACTGTATGTAGATGACCGTGGGGG TGTCTACTGGGGTCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA

(continuación)

54B12	SEQ ID NO. 211	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTG GGGGGTCTCTGACGCTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAAGCACCTTC AGAATCAATACCATGGGCTGGTACCGCCGGGCTCCAGGGAAGC AGCGCGAGTTGGTCGCAGCTCGTGATAGAGGTGGTTACATAAAC TATGTAGATTCCGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAA CGCCAAGCCCACAATGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG AGGACACGGCCGTCTATTATTGTCATGCCGGGACCCAAGATCGG ACGGGTCGGAATTTGACCGCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCA CCGTCTCCTCA
-------	----------------	--

grupo principal de CDR+FR de CXCR2 de Kabat

TABLA 19

	Marco 1	CDR1	Marco 2	CDR2	Marco 3	CDR3	Marco 4
143B03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS SEQ ID NO. 70	TYWMY SEQ ID NO. 132	WVRQAPGKGLDWV S SEQ ID NO. 91	AINAGDSTYYADPV KG SEQ ID NO. 152	RFTISRDNKNTLYLQMNSLK PEDTALYYCAT SEQ ID NO. 111	VRG- TARDLDY SEQ ID NO. 172	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
139D05	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CALSGRIGS SEQ ID NO. 71	INAMG SEQ ID NO. 133	WYRQVSGQQREL A SEQ ID NO. 92	VSRGGSTDIADSVK G SEQ ID NO. 153	RFTISRDNKNTVYLQMDSLK PEDTAVYYCYA SEQ ID NO. 112	HTSSYSN- WRVYN- NDY SEQ ID NO. 173	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
145C09	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGFTFD SEQ ID NO. 72	DYAIG SEQ ID NO. 134	WFRQAPGKERERV S SEQ ID NO. 93	CISGSDGSTYYADSV KG SEQ ID NO. 154	RFTISSDNAKNTVYLQMNLSLK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 113	YWGLTL- RLWMP- PHRYDY SEQ ID NO. 174	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
145D03	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGLIFR SEQ ID NO. 73	LSGMA SEQ ID NO. 135	WYRQAPGRQREWV A SEQ ID NO. 94	VLTKDGLLHYADPVK G SEQ ID NO. 155	RFTISRDNNAENTVYLQMNLSLK PEDTALYYCNT SEQ ID NO. 114	GRY SEQ ID NO. 175	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
139H02	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRTFS SEQ ID NO. 74	NYAMG SEQ ID NO. 136	WFRQATGKEREFV A SEQ ID NO. 95	AINKSGGNTHYAGSV KG SEQ ID NO. 156	RFTISRDNKNTVYLQMNLSLK PRDTAVYYCAA SEQ ID NO. 115	SRTNPKP- DY SEQ ID NO. 176	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
139A08	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRSFS SEQ ID NO. 75	RSAMG SEQ ID NO. 137	WLRQAPGKEREFV A SEQ ID NO. 96	GISWGGDNSYYADSV KG SEQ ID NO. 157	RFTISRDNKNTVSLQMNLSLK PQDTAVYYCAA SEQ ID NO. 116	RYRG- GAAVAG- WEY SEQ ID NO. 177	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
137A08	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGSTLA SEQ ID NO. 76	YYTVG SEQ ID NO. 138	WFRAPGKEREGI S SEQ ID NO. 97	CISGSDGSTYYADSV KG SEQ ID NO. 158	RFTISRDNKNTVYLQMNLSLK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 117	DRRTDCK- KGRVGS S SEQ ID NO. 178	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
143A05	KVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRAFN SEQ ID NO. 77	YVYMA SEQ ID NO. 139	WFRQAQGEREFV A SEQ ID NO. 98	AISTRGSMTKYSDSV QG SEQ ID NO. 159	RFTISRDNKNTVYLHNMNSLK PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 118	DPRGSS- WSFSSG- GYDY SEQ ID NO. 179	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131

(continuación)

	Marco 1	CDR1	Marco 2	CDR2	Marco 3	CDR3	Marco 4
137B07	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGIIER SEQ ID NO. 78	LSALG SEQ ID NO. 140	WTRQPGKAREWV A SEQ ID NO. 99	GINSDGTTNYADPVK G SEQ ID NO. 160	RFTISRDNAKNTIYLHMDMLK PEDTAVYYCAS SEQ ID NO. 119	GKY SEQ ID NO. 180	RQGGTQVTVSS SEQ ID NO. 132
127D01	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGSTFD SEQ ID NO. 79	FKVMG SEQ ID NO. 141	WYRQPGKQREGV A SEQ ID NO. 100	AIRLSGNMHAESVK G SEQ ID NO. 161	RFTISKANAKNTVYLQMNLSL PEDTAVYYCKV SEQ ID NO. 120	NIHQDY SEQ ID NO. 181	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
126B11	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAVSGSSFR SEQ ID NO. 80	INTMG SEQ ID NO. 142	WYRQPGKQRELV A SEQ ID NO. 101	ARDGGYINVDVSK G SEQ ID NO. 162	RFTISRDNAKPTMYLQMNLSL PEDTAVYYCHA SEQ ID NO. 121	GTQDRT- GRNFDH SEQ ID NO. 182	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
097A09	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	INTMG	WYRQPGKQRELV	DITSGGNINIDAVK	RFTISRDNKTNTVYLQMNLSL	EIVV- LVGVWTQ RARTGNY	WGQGTQVTVSS
	CVASGSIVR SEQ ID NO. 81	SEQ ID NO. 143	A SEQ ID NO. 102	G SEQ ID NO. 163	PEDTAVYYCNA SEQ ID NO. 122	SEQ ID NO. 183	SEQ ID NO. 133
159B10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRIFS SEQ ID NO. 82	SLSMG SEQ ID NO. 144	WFRQAPGKERAFV A SEQ ID NO. 103	ALTRNGGYRYADSV KG SEQ ID NO. 164	RFTISRDNVAKTLYLQMNLSL PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 123	DSLGS YLGTN- LDYSEQID NO. 184	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
163D02	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRIFS SEQ ID NO. 83	DYAMG SEQ ID NO. 145	WFRQAPGKEREFV A SEQ ID NO. 104	AITWNGGRVFTASV KG SEQ ID NO. 165	RFTISRDNAKNTMYLQMNLSL PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 124	DKDRRT- DYLGH- PVAY SEQ ID NO. 185	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
163E03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CVASGRIFS SEQ ID NO. 84	SNAMG SEQ ID NO. 146	WFRQAPGKEREFV A SEQ ID NO. 105	AITWRSAGSAYYADS AKG SEQ ID NO. 166	RFTISRDNAKNTVYLQMNLSL PEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 125	GGSS- WLSFPP- DY SEQ ID NO. 186	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
002B02	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGSILT SEQ ID NO. 85	INAMG SEQ ID NO. 147	WYRQAPGKQRELV V SEQ ID NO. 106	RRTGGSTTYQDSVK G SEQ ID NO. 167	RFTISADIAKTKMYLQMNLSL PEDTAVYYCML SEQ ID NO. 126	DDRGVY SEQ ID NO. 187	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131

(continuación)

	Marco 1	CDR1	Marco 2	CDR2	Marco 3	CDR3	Marco 4
146A06	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLT CAASGRIGT SEQ ID NO. 86	INAMG SEQ ID NO. 148	WYRQAPGKQREL A SEQ ID NO. 107	VITSGGRIDYADSVK G SEQ ID NO. 168	RFTISRDNVAKNTVYLQMNLSLK PEDTAVYYNV SEQ ID NO. 127	ETV- VGAVY SEQ ID NO. 188	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
147A01	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRMGN SEQ ID NO. 87	INAMG SEQ ID NO. 149	WYRQAPGKQREL A SEQ ID NO. 108	KITRGGAITYADSVK G SEQ ID NO. 169	RFTIARDNINLTAYLQMNLSLK PEDTAVYYNV SEQ ID NO. 128	DGGP- SQNY SEQ ID NO. 189	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
144D01	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGTIGT SEQ ID NO. 88	IRAMG SEQ ID NO. 150	WYRQAPGKQREL A SEQ ID NO. 109	LIITSGRINYADSVK G SEQ ID NO. 170	RFTIGRDNVAKNTAYLQMNLSLK PEDTAVYYNI SEQ ID NO. 129	ETLRRNY SEQ ID NO. 190	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
054B12	EVQLVESGGGLVQAGGSLTIS CAVSGSTFR SEQ ID NO. 89	INTMG SEQ ID NO. 151	WYRQAPGKQREL A SEQ ID NO. 110	ARDRGGYINYVDSVK G SEQ ID NO. 171	RFTVSRDNVAKPTMYLQMNLSLK PEDTAVYYCHA SEQ ID NO. 130	GTQDRT- GRNFDR SEQ ID NO. 191	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131

21. Polipéptidos antagonistas de CXCR2 con optimización de secuencia

Ensayo de desplazamiento térmico (TSA, por sus siglas en inglés): Se mezclaron 5 µl de Nanocuerpo monovalente purificado (80 mg/ml) con 5 µl de la sonda fluorescente Sypro Orange (Invitrogen, Carlsbad, CA, n.º de catálogo S6551) (concentración final 10x) en 10 µl de tampón (fosfato 100 mM, borato 100 mM, citrato 100 mM, NaCl 115 mM, tamponado a diferentes pH que oscilaban de 3.5 a 9). Las muestras se calentaron entonces en una máquina LightCycler 480II (Roche, Basilea, Suiza), de 37 a 90°C a 4.4°C/s, tras lo cual se enfriaron hasta 37°C a 2.2°C/s. Tras el desplegamiento inducido por calor, las zonas hidrófobas de las proteínas se exponen, a las cuales el Sypro Orange se une, lo que da lugar a un aumento en la intensidad de fluorescencia. El punto de inflexión de la primera derivada de la curva de intensidad de fluorescencia sirve como una medida de la temperatura de fusión (T_m). (Ericsson *et al.* 2006 (*Annals of Biochemistry*, 357: 289-298).

Calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés): los experimentos se llevaron a cabo en un Auto-Cap VP-DSC (MicroCal - GE Healthcare) de acuerdo con las directrices del fabricante. Las determinaciones de la temperatura de fusión de los Nanocuerpos (0.25 mg/mL) se llevaron a cabo con una tasa de calentamiento de 1 °C/min en un intervalo de temperaturas de 30°C a 95°C. Los termogramas finales se obtuvieron después de una sustracción de la línea base adecuada. La detección de picos basada en software (Origin 7.0) proporcionó las temperaturas de fusión correspondientes.

Oxidación forzada: Las muestras de Nanocuerpos (1 mg/mL) se sometieron durante cuatro horas a TA y en la oscuridad a H₂O₂ 10 mM en PBS, en paralelo con muestras de control sin H₂O₂, y posteriormente se cambió el tampón a PBS utilizando columnas de centrifugación y desalinización Zeba (0.5 mL) (Thermo Scientific). Las muestras sometidas a estrés y de control se analizaron entonces por medio de RPC en una máquina Series 1200 (Agilent Technologies) sobre una columna Zorbax 300SB-C3 (Agilent Technologies) a 70°C. La oxidación de los Nanocuerpos se cuantificó mediante determinación del % de área de pico de los prepicos, que aparecían como resultado del estrés oxidativo, en comparación con el pico proteico principal.

Optimización de secuencia de 2B2

La secuencia proteica del 2B2 precursor se alineó con las líneas germinales VH3-23 (DP-47) y JH5 humanas (Tabla 20, página 147). Las diferencias de aminoácidos relativas a la secuencia de la línea germinal humana se representan con letras, los aminoácidos idénticos con puntos. Las diferencias de aminoácidos que están subrayadas se seleccionaron para la conversión al homólogo humano, mientras que las demás se dejaron intactas.

Se produjo material monovalente purificado a partir de 2B2, CXCR20059 y CXCR20063, el cual posteriormente se caracterizó en un ensayo de competición de ligandos con FACS y un ensayo de liberación de calcio intracelular inducida por agonistas (FLIPR) tanto en CXCR2 humano como de cinomolgo. Además, la temperatura de fusión de las variantes se determinó en los ensayos de desplazamiento térmico (TSA) o por medio de calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Tabla 21). La mutación M93L en CXCR20059 y CXCR20063 suprime la sensibilidad del 2B2 precursor a la oxidación forzada.

Tabla 21 - Caracterización funcional de 2B2 monovalente y variantes con secuencia optimizada

	T _m (°C)	Cl ₅₀ de competición de hGro-α en FACS (M)		Cl ₅₀ de hGro-α en FLIPR (M)	
		hCXCR2	cCXCR2	hCXCR2	cCXCR2
2B2	73,7	1,3 X 10 ⁻⁰⁹	3,5 X 10 ⁻⁰⁸	6,5 X 10 ⁻⁰⁷	2,4 X 10 ⁻⁰⁵
CXCR20059	73,4	1,5 X 10 ⁻⁰⁹	1,9 X 10 ⁻⁰⁸	3,9 X 10 ⁻⁰⁷	1,9 X 10 ⁻⁰⁵
CXCR20063	71,9	nd	5,4 X 10 ⁻⁰⁸	6,1 X 10 ⁻⁰⁶	2,4 X 10 ⁻⁰⁵

Optimización de secuencia de 97A9

La secuencia proteica del 97A9 precursor se alineó con las líneas germinales VH3-23 (DP-47) y JH5 humanas (Tabla 22, página 147). Las diferencias de aminoácidos relativas a la secuencia de la línea germinal humana se representan con letras, los aminoácidos idénticos con puntos. Las diferencias de aminoácidos que están subrayadas se seleccionaron para la conversión al homólogo humano, mientras que las demás se dejaron intactas.

Se produjo material monovalente purificado a partir de 97A9 y CXCR20061, el cual posteriormente se caracterizó en un ensayo de competición de ligandos con FACS y un ensayo de liberación de calcio intracelular inducida por agonistas (FLIPR) tanto en CXCR2 humano como de cinomolgo. Además, la temperatura de fusión de las variantes se determinó en los ensayos de desplazamiento térmico (TSA) (Tabla 23).

Tabla 23 - Caracterización funcional de 979A9 monovalente y variante con secuencia optimizada

ID	T _m (°C)	Cl ₅₀ de competición de hGro-α en FACS		Cl ₅₀ de hGro-α en FLIPR (M)	
		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

Optimización de secuencia de 163E3

La secuencia proteica del 163E3 precursor se alineó con las líneas germinales VH3-23 (DP-47) y JH5 humanas (Tabla 24, página 147). Las diferencias de aminoácidos relativas a la secuencia de la línea germinal humana se representan con letras, los aminoácidos idénticos con puntos. Las diferencias de aminoácidos que están subrayadas se seleccionaron para la conversión al homólogo humano, mientras que las demás se dejaron intactas.

Se produjo material monovalente purificado a partir de 163E3 y CXCR20076, el cual posteriormente se caracterizó en un ensayo de competición de ligandos con FACS y un ensayo de liberación de calcio intracelular inducida por agonistas (FLIPR) tanto en CXCR2 humano como de cinomolgo. Además, la temperatura de fusión de las variantes se determinó en los ensayos de desplazamiento térmico (TSA) (Tabla 25).

Tabla 25 - Caracterización funcional de 163E3 monovalente y variante con secuencia optimizada

	T _m (°C)	Cl ₅₀ de competición de hGro-α en FACS (M)		Cl ₅₀ de hGro-α en FLIPR (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

Optimización de secuencia de 127D1

La secuencia proteica del 127D1 precursor se alineó con las líneas germinales VH3-23 (DP-47) y JH5 humanas (Tabla 26, página 147). Las diferencias de aminoácidos relativas a la secuencia de la línea germinal humana se representan con letras, los aminoácidos idénticos con puntos. Las diferencias de aminoácidos que están subrayadas se seleccionaron para la conversión al homólogo humano, mientras que las demás se dejaron intactas.

Se produjo material monovalente purificado a partir de 127D1 y CXCR20079, el cual posteriormente se caracterizó en un ensayo de competición de ligandos con FACS y un ensayo de liberación de calcio intracelular inducida por agonistas (FLIPR) tanto en CXCR2 humano como de cinomolgo. Además, la temperatura de fusión de las variantes se determinó en los ensayos de desplazamiento térmico (TSA) (Tabla 27). La mutación M57R en CXCR20079 suprime la sensibilidad del 127D1 precursor a la oxidación forzada.

Tabla 27 - Caracterización funcional de 127D1 monovalente y variante con secuencia optimizada

	T _m (°C)	Cl ₅₀ de competición de hGro-α en FACS (M)		Cl ₅₀ de hGro-α en FLIPR (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

Optimización de secuencia de 163D2

La secuencia proteica del 163D2 precursor se alineó con las líneas germinales VH3-23 (DP-47) y JH5 humanas (Tabla 28, página 148). Las diferencias de aminoácidos relativas a la secuencia de la línea germinal humana se representan con letras, los aminoácidos idénticos con puntos. Las diferencias de aminoácidos que están subrayadas se seleccionaron para la conversión al homólogo humano, mientras que las demás se dejaron intactas.

Se produjo material monovalente purificado a partir de 163D2 y CXCR20086, el cual posteriormente se caracterizó en un ensayo de competición de ligandos con FACS y un ensayo de liberación de calcio intracelular inducida por agonistas (FLIPR) tanto en CXCR2 humano como de cinomolgo. Además, la temperatura de fusión de las variantes se determinó en los ensayos de desplazamiento térmico (TSA) (Tabla 29).

Tabla 29 - Caracterización funcional de 163D2 monovalente y variante con secuencia optimizada

	T _m (°C)	Cl ₅₀ de competición de hGro-α en FACS (M)		Cl ₅₀ de hGro-α en FLIPR (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

Optimización de secuencia de 54B12

La secuencia proteica del 54B12 precursor se alineó con las líneas germinales VH3-23 (DP-47) y JH5 humanas (Tabla 30, página 148). Las diferencias de aminoácidos relativas a la secuencia de la línea germinal humana se representan con letras, los aminoácidos idénticos con puntos. Las diferencias de aminoácidos que están subrayadas se seleccionaron para la conversión al homólogo humano, mientras que las demás se dejaron intactas.

Se produjo material monovalente purificado a partir de 54B12, CXCR20103 y CXCR2104, el cual posteriormente se caracterizó en un ensayo de competición de ligandos con FACS y un ensayo de liberación de calcio intracelular inducida por agonistas (FLIPR) tanto en CXCR2 humano como de cinomolgo. Además, la temperatura de fusión de las variantes se determinó en los ensayos de desplazamiento térmico (TSA) (Tabla 31).

Tabla 31 - Caracterización funcional de 54B12 monovalente y variante con secuencia optimizada

ID	T _m (°C)	Cl ₅₀ de competición de hGro-α en FACS (M)		Cl ₅₀ de hGro-α en FLIPR (M)	
		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	por determinar	nf*	1,3 X 10 ⁻⁰⁸	5,9 X 10 ⁻⁸	3,5 X 10 ⁻⁶

Tabla 20 – Alineamiento de 2B2 y variantes con secuencia optimizada

[illegible]

Tabla 22 - Alineamiento de 97A9 y variante con secuencia optimizada

Kabat#	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
VH3-23/JH5	:										
CXCR297A9	:	EVQLLESGGLVPGSSLRCSLRCSRAAGSFYSSAYNRQAPKGELEWYSAISGGSGFTYASVKRFTISRQNSKLNLY-QMANSRAEDAVVYCAK									
CXCR20061	:	V.....	SIVRINT.G.Y.I	QR.L.AD.T	NIN.I.A	T	V	K ²		NAEIVLVGVMTQARTGNY	Q
	:	SIVRINT.G.Y	QR.L.AD.T	NIN						NAEIVLVGVMTQARTGNY	

Tabla 24 - Alineamiento de 163E3 y variante con secuencia optimizada

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
Kabat#	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
VH3-23/JH5	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	EVOLLESGGLVQ	PGGSLRCAASG	FTSSYAMSWR	QAPGKLEWVSA	ISG-SGGSIVYADSV	RGRTTIS	RCNSKNLTLQ	MSRAEDTAVV	CAK-.....	WGCGLTIVT	YSS
CXRk2-63E3	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	V.....	KL.....	N.....	C.....	F.....	ER.....	F.....	A.....	V.....	ACSSWLSP	PPDY.....
CXRk20076	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
	R.....	L.....	N.....	C.....	F.....	ER.....	F.....	A.....	V.....	ACSSWLSP	PPDY.....

Tabla 26 - alineamiento de 127D1 y variante con secuencia optimizada

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

Tabla 28 - Alineamiento de 163D2 y variante con secuencia optimizada

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
Kabat#	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
VH3-23/JH5	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
CXCR2163D2	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
CXCR20086	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:

Tabla 30 - alineamiento de 54B12 y variantes de secuencia optimizada

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
Kabat#	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
VH3-23/JH5	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
CXCR254B12	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
CXCR20103	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
CXCR20104	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:

Tabla 32 - Secuencias de aminoácidos de las variantes con secuencia optimizada

CXCR20059	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIITINAMGWYRQAPGKQRELVVRTRGGSTTYQDSVK GRFTISADISKKTMYLQMNSLRPEDTAVYYCLDDRGGVYWGQGLTLTVSS	SEQ ID NO. 213
CXCR20063	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIITINAMGWYRQAPGKQRELVVRTRGGSTTYQDSVK GRFTISADISKNTMYLQMNSLRPEDTAVYYCLDDRGGVYWGQGLTLTVSS	SEQ ID NO. 214
CXCR20061	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIIVRINTMGWYRQAPGKQRELVDITSGGNINYADSVK GRFTISRDNSTVYLYQMNSLRPEDTAVYYCNAEIVLVGVWTRARTGNYWGQGLTLTVSS	SEQ ID NO. 215
CXCR20079	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDFKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLSGNRHYAESVK GRFTISRANSKNTVYLYQMNSLRPEDTAVYYCKVNIRGQDYWGQGLTLTVSS	SEQ ID NO. 216
CXCR20076	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSAGSAYYADS VKGRFTISRDNSTVYLYQMNSLRPEDTAVYYCAAGSSWLSFPPDYWGQGLTLTVSS	SEQ ID NO. 217
CXCR20086	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGGRVFTASV KGRFTISRDNSTVYLYQMNSLRPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGLTLTVSS	SEQ ID NO. 218
CXCR20104	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSTFRINTMGWYRQAPGKQRELVAARDKGGYINYYVDSVK GRFTISRDNSTVYLYQMNSLRPEDTAVYYCHAGTQDRTRGNFDRWGQGLTLTVSS	SEQ ID NO. 219

Tabla 33 secuencias de aminoácidos de biparatópicos con secuencia optimizada (que incluyen HLE con Alb8):

CXCR20079-35GS-CXCR20076	SEQ ID NO. 221	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDEKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLSGNRHYAESVKGRFTISRANSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIHQDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRI FSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSAYYADSVKGRFTISRDN SKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGSSWLSFPDPYWGQGLTVTVSS
CXCR20079-35GS-CXCR20086	SEQ ID NO. 222	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDEKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLSGNRHYAESVKGRFTISRANSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIHQDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGGRVFTASVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGLTVTVSS
CXCR20104-35GS-CXCR20076	SEQ ID NO. 223	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSTFRINTMGWYRQAPGKQRELVAARDGGYINYYVDSVKGRFTISRDN SKP TMYLQMNSLRPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNEDRWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRI FSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSAYYADSVKGRFTISR DN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGSSWLSFPDPYWGQGLTVTVSS
CXCR20104-35GS-CXCR20086	SEQ ID NO. 224	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSTFRINTMGWYRQAPGKQRELVAARDGGYINYYVDSVKGRFTISRDN SKP TMYLQMNSLRPEDTAVYYCHAGTQDRTGRNEDRWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGGRVFTASVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADKDRRTDYLGHVPVAYWGQGLTVTVSS
CXCR20079-35GS- CXCR20076-35GS-Alb8	SEQ ID NO. 225	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDEKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLSGNRHYAESVKGRFTISRANSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIHQDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRI FSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITWRSGGSAYYADSVKGRFTISRDN SKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGSSWLSFPDPYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFGMSWYRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR NAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSRSGQGLTVTVSS
CXCR20079-35GS- CXCR20061-35GS-Alb8	SEQ ID NO. 226	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFDEKVMGWYRQAPGKQREGVAAIRLSGNRHYAESVKGRFTISRANSKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCKVNIHQDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRI FSSNAMGWFRQAPGKEREFVAAITSGNINYYADSVKGRFTISRDN SKN TVYLQMNSLRPEDTAVYYCNAEIVLVGVWYRQARTGNWYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFGMSWYRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGR FTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSRSGQGLTVTVSS

Tabla 34 - secuencias de aminoácidos de precursores y variantes con secuencia optimizada que incluyen anotaciones de CDR (Kabat) y regiones de marco:

	Marco 1	CDR1	Marco 2	CDR2	Marco 3	CDR3	Marco 4
CXCR20059	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGSILT SEQ ID NO. 229	INAMG SEQ ID NO. 147 VA	WYRQAPGKQREL SEQ ID NO. 106 VA	RRTRGGSTTYQDSVK G SEQ ID NO. 167	RFTISADISKNTMYLQMN SLRPEDTAVYYCCL SEQ ID NO. 238	DDRGVY SEQ ID NO. 187	WGQGTLLTVSS SEQ ID NO. 245
CXCR20063	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGSILT SEQ ID NO. 229	INAMG SEQ ID NO. 147 VA	WYRQAPGKQREL SEQ ID NO. 106 VA	RRTRGGSTTYQDSVK G SEQ ID NO. 167	RFTISADISKNTMYLQMN SLRPEDTAVYYCCL SEQ ID NO. 239	DDRGVY SEQ ID NO. 187	WGQGTLLTVSS SEQ ID NO. 245
002B02	EVQLVESGGELVQPGGSLR LSCAASGSILT SEQ ID NO. 85	INAMG SEQ ID NO. 147 VA	WYRQAPGKQREL SEQ ID NO. 106 VA	RRTRGGSTTYQDSVK G SEQ ID NO. 167	RFTISADIAKNTMYLQMN SLKPEDTAVYYCML SEQ ID NO. 126	DDRGVY SEQ ID NO. 187	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
CXCR20061	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGSIVR SEQ ID NO. 230	INTMG SEQ ID NO. 143 VA	WYRQAPGKQREL SEQ ID NO. 234 VA	DITSGGNINYADSVK G SEQ ID NO. 235	RFTISRDNKNTVYLQMN NSLRPEDTAVYYCNA SEQ ID NO. 240	EIVLVGVMWTQ RARTGNY SEQ ID NO. 183	WGQGTLLTVSS SEQ ID NO. 245
097A09	EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCVASGSIVR SEQ ID NO. 81	INTMG SEQ ID NO. 143 VA	WYRQTPGKQREL SEQ ID NO. 102 VA	DITSGGNINYIDAVK G SEQ ID NO. 163	RFTISRDNKNTVYLQMN NSLRPEDTAVYYCNA SEQ ID NO. 122	EIVLVGVMWTQ RARTGNY SEQ ID NO. 183	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 133
CXCR20079	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGSTFD SEQ ID NO. 231	FKVMG SEQ ID NO. 141 VA	WYRQAPGKQREG SEQ ID NO. 235 VA	AIRLSGNRHYAESVK G SEQ ID NO. 236	RFTISRANSKNTVYLQMN NSLRPEDTAVYYCKV SEQ ID NO. 241	NIRGQDY SEQ ID NO. 181	WGQGTLLTVSS SEQ ID NO. 245
127D01	EVQLVESGGGLVQAGESLR LSCAASGSTFD SEQ ID NO. 79	FKVMG SEQ ID NO. 141 VA	WYRQPPGKQREG SEQ ID NO. 100 VA	AIRLSGNMHHYAESVK G SEQ ID NO. 161	RFTISKANAKNTVYLQMN NSLRPEDTAVYYCKV SEQ ID NO. 120	NIRGQDY SEQ ID NO. 181	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
CXCR20076	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGRIFS SEQ ID NO. 232	SNAMG SEQ ID NO. 146 VA	WFRQAPGKREF SEQ ID NO. 105 VA	AITWRSGGSAYYADSV KG SEQ ID NO. 237	RFTISRDNKNTVYLQMN NSLRPEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 242	GGSSWLSFPPD Y SEQ ID NO. 186	WGQGTLLTVSS SEQ ID NO. 245
163E03	EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCVASGRIFS SEQ ID NO. 84	SNAMG SEQ ID NO. 146 VA	WFRQAPGKREF SEQ ID NO. 105 VA	AITWRSGGSAYYADSA KG SEQ ID NO. 166	RFTISRDNKNTVYLQMN NSLRPEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 125	GGSSWLSFPPD Y SEQ ID NO. 186	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
CXCR20086	EVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGRFTS SEQ ID NO. 233	DYAMG SEQ ID NO. 145 VA	WFRQAPGKREF SEQ ID NO. 104 VA	AITWNGGRVFTASVK G SEQ ID NO. 165	RFTISRDNKNTVYLQMN NSLRPEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 243	DKDRRTDYLGH PVAY SEQ ID NO. 185	WGQGTLLTVSS SEQ ID NO. 245

(continuación)

	Marco 1	CDR1	Marco 2	CDR2	Marco 3	CDR3	Marco 4
163D02	EVQLVESGGGLVQAGGSLR LSCAASGRFTS SEQ ID NO. 83	DYAMG SEQ ID NO. 145	WFRQAPGKEREF VA SEQ ID NO. 104	AITWNGGRVFTASVK G SEQ ID NO. 165	RFTISRDNKNTMYLQM NSLKPEDTAVYYCAA SEQ ID NO. 124	DKRRRTDYLGH PVAY SEQ ID NO. 185	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131
CXCR20104	EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAVSGSTFR SEQ ID NO. 234	INTMG SEQ ID NO. 151	WYRQAPGKQREL VA SEQ ID NO. 234	ARDRGGYINYVDSVKG SEQ ID NO. 171	RFTISRDNKSKPTMYLQM NSLRPEDTAVYYCHA SEQ ID NO. 244	GTQDRTGRNF DR SEQ ID NO. 191	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 245
054B12	EVQLVESGGGLVQAGGSLT LSCAVSGSTFR SEQ ID NO. 89	INTMG SEQ ID NO. 151	WYRRAPGKQREL VA SEQ ID NO. 110	ARDRGGYINYVDSVKG SEQ ID NO. 171	RFTVSRDNKPTMYLQM NSLKPEDTAVYYCHA SEQ ID NO. 130	GTQDRTGRNF DR SEQ ID NO. 191	WGQGTQVTVSS SEQ ID NO. 131

Tabla 35 - anotaciones de CDR de Chotia de las variantes con secuencia optimizada

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

22. Mapeo de epítomos

El mapeo de epítomos de los nanocuerpos fue llevado a cabo por Integral Molecular Inc., 3711 Market street, Suite 900, Filadelfia, PA, EE. UU., www.integralmolecular.com utilizando su tecnología de mutagénesis aleatoria.

5 **Resumen de la tecnología de mutagénesis aleatoria**

La mutagénesis aleatoria utiliza una tecnología de expresión celular de alto rendimiento patentada que permite la expresión y análisis de grandes colecciones de proteínas diana mutadas en células eucariotas. Cada residuo en una proteína se muta individualmente, normalmente a múltiples aminoácidos diferentes, con el fin de evaluar los cambios en la función. Las proteínas se expresan en líneas celulares de mamíferos estándar, de modo que incluso las proteínas difíciles que requieren procesamiento de traducción o posterior a la traducción en eucariotas se pueden mapear.

La nomenclatura para el mapeo de epítomos es la siguiente:

RDHBC 792 = CXCR20079

RDHBC 793 = CXCR20061

RDHBC 792 = CXCR20076

15 Los epítomos de los anticuerpos anti-CXCR2 RD-HBC792 (CXCR20079), RD-HBC793 (CXCR20061) y RD-HBC794 (CXCR20076) se mapearon con una resolución a nivel de un único aminoácido utilizando la mutagénesis aleatoria de la siguiente manera.

20 Constructo precursor: El gen precursor no etiquetado se clonó en un vector muy expresado, se secuenció y se validó en cuanto a su expresión mediante inmunodetección. Optimización de Nanocuerpos: la detección de nanocuerpos se llevó a cabo en el formato de mutagénesis aleatoria sometiendo a ensayo un grupo de diluciones de nanocuerpos en microplacas de 384 pocillos. Se seleccionó una concentración óptima de cada nanocuerpo para cribar la colección de mutaciones. La colección de mutaciones se completó y cada posición aminoacídica se mutó a una modificación conservada y no conservada, que incluía la mutación de cada residuo a una sustitución de Ala. Se evaluó la expresión superficial de la colección y se cribó, por triplicado, para determinar la unión de los nanocuerpos mediante inmunodetección. Se llevó a cabo un análisis de la colección para determinar la pérdida de unión de los nanocuerpos, se identificaron los residuos críticos y se mapearon.

30 Se llevó a cabo una inmunodetección de la expresión de constructos precursores del constructo precursor de origen natural expresado de forma transitoria en un formato de 384 pocillos por inmunoluminiscencia e inmunofluorescencia. Para todos los experimentos, los pasos de manipulación de líquidos implicados en la transfección e inmunotinción celular se llevaron a cabo utilizando robots de manipulación de líquidos para garantizar la precisión y una elevada reproducibilidad experimental.

Tabla 36. Parámetros experimentales utilizados para evaluar el plásmido precursor.

Parámetro experimental	Inmunoluminiscencia	Inmunofluorescencia
Células	HEK-293T	HEK-293T
Fijador	PFA al 4%	PFA al 4%
Tampón de bloqueo	Suero de cabra al 10%	Suero de cabra al 10%
1°MAB Conc. diana Incubación N.º de catálogo del fabricante	α-CXCR2 2 ug/ml 1 hora R&D Systems MAB331	α-CXCR2 3 ug/ml 1 hora R&D Systems MAB331

(continuación)

Parámetro experimental	Inmunoluminiscencia	Inmunofluorescencia
2°MAb Conc. diana N.º de catálogo del fabricante	α-ratón HRP 0.8 ug/ml Jackson ImmunoResearch 115-035-003	α-ratón Dyelight 549 3.75 ug/ml Jackson ImmunoResearch 115-505-003
Lavados	PBS++	PBS++
Señal:Ruido	29:1	2,2:1
% CV de precursor	4,7%	12%

Tabla 37. Parámetros experimentales utilizados para la inmunodetección policlonal

Detección de expresión total de receptores en la superficie celular utilizando suero policlonal. El suero policlonal (capaz de reaccionar con todos los mutantes) se utiliza para cuantificar la expresión total de modo que se pueda detectar cada clon de la colección de mutaciones. Parámetro experimental	Inmunodetección policlonal
Células	HEK-293T
Fijador	PFA al 4%
Tampón de bloqueo	Suero de cabra al 10%
1°PAb Conc. diana Incubación N.º de catálogo del fabricante	α-CXCR2 dilución 1:1000 1 hora Novus NBP1-49218
2°MAb Conc. diana N.º de catálogo del fabricante	α-conejo HRP 0.8 ug/ml Southern Biotech 4050-05
Lavados	PBS++
Señal:Ruido	17:1
% CV	10%

Conclusión: Se detecta la expresión superficial estable y la expresión total para el constructo precursor de origen natural utilizando un MAb de control y un suero policlonal, de modo que el constructo precursor de origen natural se puede utilizar para mutagénesis aleatoria. El ensayo de inmunoluminiscencia muestra una relación señal:ruido elevada y una variabilidad baja y se utilizará para los estudios de mapeo.

La inmunodetección se optimizó utilizando nanocuerpos de mapeo. La inmunodetección se llevó a cabo en un formato de 384 pocillos, utilizando células transfectadas de forma transitoria con plásmido del vector solamente o del receptor de origen natural. Las concentraciones seleccionadas para los estudios de mapeo adicionales se basaron en una señal prácticamente máxima con una relación señal:ruido elevada y una variabilidad baja.

Condiciones de ensayo final para el cribado de la colección de mutaciones

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%
Tampón de bloqueo	Suero de cabra al 10%	Suero de cabra al 10%	Suero de cabra al 10%
1°MAb			
Diana	α-CXCR2	α-CXCR2	α-CXCR2
Conc. óptima	1.0 ug/ml	1.0 ug/ml	2.0 ug/ml
Incubación	1 hora	1 hora	1 hora
2°MAb			
Conc. diana Incubación	α-myc 2 ug/ml 1 hora	α-myc 2 ug/ml 1 hora	α-myc 2 ug/ml 1 hora
Nombre del anticuerpo del fabricante	Hibridoma propio 9E10	Hibridoma propio 9E10	Hibridoma propio 9E10
3°MAb			
Diana	α-ratón HRP	α-ratón HRP	α-ratón HRP

(continuación)

Parámetro experimental	RD-HBC792	RD-HBC793	RD-HBC794
Conc. Fabricante	0.8 ug/ml Jackson	0.8 ug/ml Jackson	0.8 ug/ml Jackson
N.º de catálogo	Immunoresearch	Immunoresearch	Immunoresearch
	115-035-003	115-035-003	115-035-003
Lavados	PBS++	PBS++	PBS++
Señal:Ruido	13:1	6,9:1	20:1
% CV	7,9%	22%	13%

Tabla 38. Parámetros experimentales utilizados para la detección de ensayo optimizada en formato de 384 pocillos de mutagénesis aleatoria. Las condiciones de ensayo optimizadas definidas en la presente se utilizaron para mapear la colección de mutaciones de CXCR2 en un formato de 384 pocillos. Cada clon en la colección se expresó en células mediante transfección transitoria y se sometió a ensayo para determinar la reactividad de los anticuerpos aproximadamente 18 horas después de la transfección. Los nanocuerpos de CXCR2 RD-HBC792, RD-HBC793 y RD-HBC794 carecen de regiones Fc, pero contienen una etiqueta myc, por lo que se utilizó una estrategia de detección en múltiples pasos en la que se utilizó un anticuerpo anti-myc de ratón (9E10) intermedio y la posterior detección con un anticuerpo HRP anti-ratón.

Conclusión: Se determinaron las condiciones finales para la inmunodetección y el mapeo de epítomos de 3 nanocuerpos de CXCR2. Las condiciones optimizadas dieron como resultado una relación señal:ruido elevada y una variabilidad baja en el formato de mutagénesis aleatoria, y se pudieron utilizar, por tanto, para el mapeo de epítomos con una confianza elevada. El mapeo de epítomos conllevó aplicar las mismas condiciones de ensayo determinadas en la presente, pero con una colección de mutaciones de las variantes de los receptores.

Identificación de residuos críticos para los epítomos de los nanocuerpos

ID del residuo	Mutaciones	ID del clon	Policlonal		RD HBC 792		RD HBC 793		RD HBC 794	
			Media	Desv. estánd.	Media	Desv. estánd.	Media	Desv. estánd.	Media	Desv. estánd.
11	F11A	10	39.9	17.0	7.1	2.1	81.1	13.7	81.6	20.6
	F11Y	975	70.5	6.2	26.7	14.7	113.9	5.4	100.2	29.1
14	F14A	486	35.4	5.4	9.4	3.9	98.6	8.7	110.3	5.5
	F14Y	1170	100.2	16.7	53.0	10.0	117.7	46.6	124.9	4.6
15	W15A	116	69.2	2.8	6.4	1.4	125.4	18.6	114.5	13.1
	W15Y	1075	92.3	6.2	14.9	6.4	112.2	27.9	110.8	11.4
39	C39A	95	86.2	6.0	65.0	6.7	7.6	7.1	10.1	0.7
	C39N	1099	108.7	8.8	94.4	34.9	4.7	6.7	9.2	4.4
112	W112A	318	88.2	12.9	102.8	28.7	15.5	7.4	25.4	6.6
	W112Y	1462	109.9	13.6	106.1	25.1	37.1	6.2	39.9	16.1
114	F114A	211	88.9	5.8	73.1	10.6	26.3	8.4	33.4	10.2
	F114Y	1560	122.3	14.6	87.4	21.0	102.2	25.4	116.8	37.2
115	G115A	320	82.7	7.7	70.4	14.1	13.2	5.2	18.3	2.2
	G115T	1561	82.4	40.6	89.7	9.8	61.7	14.8	55.6	6.6
188	Y188A	765	89.6	21.2	100.0	37.7	102.8	12.4	20.1	6.3
	Y188F	1634	133.8	16.2	106.8	14.2	87.1	31.1	107.2	11.7
196	C196A	963	86.9	16.4	99.9	17.2	1.2	7.0	8.8	2.4
	C196N	1836	97.9	8.1	90.9	14.3	7.3	2.1	9.3	3.3
274	D274A	889	101.4	14.9	102.2	1.9	21.4	7.0	29.4	9.2
	D274E	1955	80.3	20.3	97.5	6.6	52.1	13.2	60.4	14.3
282	I282A	669	79.6	10.7	66.8	17.7	25.5	12.2	24.6	8.8
	I282N	1989	58.8	9.2	78.5	13.7	6.9	18.0	10.3	3.1
285	T285A	770	64.8	14.3	53.1	2.4	17.1	9.7	28.8	13.6
	T285S	2215	154.4	65.9	91.8	23.2	116.4	37.0	121.5	27.0
286	C286A	771	87.3	19.6	57.4	9.6	5.6	6.5	6.2	2.0
	C286N	2024	92.0	20.9	58.0	13.5	1.3	9.3	11.7	8.2
293	D293A	778	131.5	4.9	100.8	49.9	15.9	8.2	44.9	17.6
	D293E	2127	150.3	23.4	138.9	24.6	73.3	26.5	141.9	19.4

Tabla 39. Identificación de residuos críticos. Los residuos críticos para los MAb se identificaron comparando las reactividades de nanocuerpos de los clones frente a la reactividad policlonal (expresión superficial). Los residuos implicados en el epítipo de los anticuerpos se identificaron como aquellos que eran negativos para la unión a nanocuerpo, pero positivos para la unión policlonal, incluían una sustitución de residuo de Ala (es decir, eliminación de la cadena lateral del residuo), y se situaban en los bucles extracelulares. Se muestran las reactividades medias y

la desviación estándar para la unión a MAb y la unión a anticuerpos policlonales. Los residuos críticos identificados para cada MAb se somborean en color gris. El dato para RD HBC792 también se comparó con RD HBC793, puesto que se determinó que el perfil de unión para RD HBC792 era similar al suero policlonal comercial (el cual procedía del dominio extracelular N terminal de CXCR2 humano, lo que explica probablemente la reactividad reducida del suero frente a las mutaciones F11, F14, y W15).

Análisis adicional de la información de los epítomos

Los aminoácidos críticos identificados mediante mapeo por mutagénesis aleatoria definen el o los sitios de unión para los 3 MAb de CXCR2. El MAb RD HBC792 se asigna por mapeo a la región N terminal de CXCR2, y la estrecha proximidad de los residuos críticos sugiere que el epítipo es de naturaleza lineal. Al parecer, los MAb RD HBC793 y RD HBC794 se unen a un epítipo complejo desde el punto de vista conformacional formado principalmente por ECL1 y ECL3 de CXCR2. La mutación de los residuos de Cys extracelulares, de los que se tiene constancia que forman dos puentes disulfuro que mantienen los bucles extracelulares en su lugar en los receptores de quimiocina, también suprime la unión de los MAb 793 y 794, por lo que no se cree que estén directamente implicados en la interacción del epítipo. Los epítomos 793 y 794 se superponen de forma significativa, aunque son evidentes algunas diferencias sutiles entre los dos.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende al menos dos dominios de unión a antígeno de inmunoglobulina, donde el polipéptido se dirige contra el receptor de quimiocinas CXCR2 o se une a él, donde dicho polipéptido incluye un primer dominio de unión a antígeno comprendido dentro de un primer dominio variable único de inmunoglobulina, que reconoce un primer epítipo en CXCR2 y es capaz de unirse a un péptido lineal compuesto por la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 7 y un segundo dominio de unión a antígeno comprendido dentro de un segundo dominio variable único de inmunoglobulina de un anticuerpo, y donde dicho segundo dominio de unión a antígeno se une a un epítipo dentro de los bucles externos de CXCR2 humano (residuos de aminoácidos 106-120, 184-208 y 274-294 de la SEQ ID N.º 1), y donde el polipéptido es un antagonista de la transducción de señales de CXCR2.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, donde al menos uno de dichos primer y segundo dominios de unión a antígeno está comprendido dentro de un dominio V_{HH} o un fragmento de este de una única cadena pesada de un anticuerpo de cadenas pesadas que se puede obtener de un Camélido o es una variante humanizada de este.
3. El polipéptido de la reivindicación 2, donde cada uno de dichos dominios de unión a antígeno está comprendido dentro de un dominio V_{HH} o fragmento de este de una única cadena pesada de un anticuerpo de cadenas pesadas procedente de un Camélido o es una variante humanizada de este.
4. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dichos al menos dos dominios de unión a antígeno están unidos por un conector.
5. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 que tiene una de las siguientes estructuras:
 - i) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--CONECTOR--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8
 - ii) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--CONECTOR--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8--CONECTOR--HLE
 - iii) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4--CONECTOR--HLE--CONECTOR--FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8
- donde si FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 comprende el primer dominio de unión a antígeno, entonces FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 comprende el segundo dominio antigénico y si FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 comprende el segundo dominio antigénico, entonces FR5-CDR4-FR6-CDR5-FR7-CDR6-FR8 comprende el primer dominio de unión a antígeno y la HLE es una unidad de unión que proporciona una semivida *in vivo* aumentada.
6. El polipéptido de la reivindicación 5, donde el primer dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de las SEQ ID N.º 213, 214, 216 y 219, y el segundo dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de las SEQ ID N.º 215, 217 y 218.
7. El polipéptido de la reivindicación 5, donde en dicha primera inmunoglobulina de un dominio variable único CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 141, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 236 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 181 y donde en dicha segunda inmunoglobulina de un dominio variable único CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 146, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 237 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 186.
8. El polipéptido de la reivindicación 7, donde el primer dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID N.º 216, y el segundo dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID N.º 217
9. Un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende la SEQ ID N.º 221.
10. El polipéptido de la reivindicación 5, donde en dicha primera inmunoglobulina de un dominio variable único CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 141, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 236 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 181 y donde en dicha segunda inmunoglobulina de un dominio variable único CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 145, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 165 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 185.
11. El polipéptido de la reivindicación 10, donde el primer dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID N.º 216, y el segundo dominio de unión a antígeno se selecciona a partir de la SEQ ID N.º 218.
12. Un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende la SEQ ID N.º 222.

13. El polipéptido de la reivindicación 5, donde en dicha primera inmunoglobulina de un dominio variable único CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 141, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 236 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 181 y donde en dicha segunda inmunoglobulina de un dominio variable único CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 143, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 235 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 183.
14. El polipéptido de la reivindicación 5, donde en dicha primera inmunoglobulina de un dominio variable único CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 151, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 171 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 191 y donde en dicha segunda inmunoglobulina de un dominio variable único CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 146, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 237 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 186.
15. El polipéptido de la reivindicación 5, donde en dicha primera inmunoglobulina de un dominio variable único CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 151, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 171 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 191 y donde en dicha segunda inmunoglobulina de un dominio variable único CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 145, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 165 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 185.
16. El polipéptido de la reivindicación 5, donde en dicha primera inmunoglobulina de un dominio variable único CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 151, CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 171 y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 191 y donde en dicha segunda inmunoglobulina de un dominio variable único CDR4 comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID N.º 143, CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 235 y CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 183.
17. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que comprende regiones de marco parcial o totalmente humanizadas.
18. El polipéptido de las reivindicaciones 1-17, donde dicho primer dominio de unión a antígeno se une a un epítipo que comprende los aminoácidos F11, F14 y W15 de la SEQ ID N.º 1.
19. El polipéptido de la reivindicación 18, donde dicho epítipo es lineal.
20. El polipéptido de la reivindicación 19, donde dicho epítipo se encuentra dentro de los residuos de aminoácidos 106-120 y de la SEQ ID N.º 1.
21. El polipéptido de la reivindicación 19, donde dicho epítipo es conformacional.
22. El polipéptido de la reivindicación 21, donde dicho segundo dominio de unión a antígeno se une a un epítipo de CXCR2, que comprende los residuos de aminoácidos W112, G115, I282 y T285 de la SEQ ID N.º 1.
23. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, que se modifica para que tenga una semivida *in vivo* aumentada, en comparación con la secuencia de aminoácidos no modificada correspondiente.
24. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 23, donde dicha semivida aumentada se proporciona con una o más unidades de unión seleccionadas a partir del grupo compuesto por seroproteínas o fragmentos de estas, unidades de unión que se pueden unir a seroproteínas, una porción Fc y proteínas o péptidos de bajo peso molecular que se pueden unir a seroproteínas.
25. El polipéptido de la reivindicación 24, donde la unidad de unión comprende la SEQ ID N.º 228 (Alb8).
26. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, que es capaz de bloquear de forma cruzada la unión a CXCR2 con un polipéptido de la reivindicación 9 o 12.
27. Un polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, compuesto por una secuencia seleccionada a partir de las SEQ ID N.ºs 225, 226 o 227.
28. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27.

29. Un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico tal como se reivindica en la reivindicación 28.

30. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

5 31. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 para su uso como un medicamento.

32. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 para su uso en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y exacerbaciones de la EPOC.

10 33. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística, asma, asma grave, exacerbaciones de asma, asma alérgica, lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda, fibrosis pulmonar idiopática, remodelación de las vías aéreas, síndrome de bronquiolitis obliterante o displasia broncopulmonar.

15 34. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 para su uso en el tratamiento de aterosclerosis, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria del intestino (de Chron), angiogénesis y enfermedades caracterizadas por el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos que incluyen degeneración macular, retinopatía diabética y neuropatía diabética, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad degenerativa macular asociada a la edad, enfermedad de Behcet ocular, uveítis, hipertensión arterial pulmonar (HAP) que incluye la HAP idiopática, HAP familiar y HAP asociada, enfermedades inflamatorias crónicas, artritis reumatoide, osteoartritis, carcinoma no microcítico, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer esofágico, cáncer ovárico, cáncer de mama, tumores sólidos y metástasis, melanoma, carcinoma hepatocelular, lesión por isquemia-reperfusión, crisis de vasooclusión inducida por transfusión hemolítica
20 en la enfermedad de células falciformes, lesión por isquemia/reperfusión, infarto de miocardio/accidente cerebrovascular agudo, lesión craneal cerrada, inflamación postraumática o diabetes insulinoresistente.